



# Migration cellulaire : identification d'Arpin, un nouvel inhibiteur du complexe Arp2/3, et mécanismes moléculaires de sa régulation

Irene Dang

## ► To cite this version:

Irene Dang. Migration cellulaire : identification d'Arpin, un nouvel inhibiteur du complexe Arp2/3, et mécanismes moléculaires de sa régulation. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112172 . tel-01281308

**HAL Id: tel-01281308**

**<https://theses.hal.science/tel-01281308>**

Submitted on 2 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD  
ÉCOLE DOCTORALE 426 :  
*Gènes, Génomes, Cellules*

Au Laboratoire d'Enzymologie et biochimie structurales

# THÈSE SUR TRAVAUX

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

**Irène DANG**

**Migration cellulaire:  
identification d'Arpin, un nouvel inhibiteur du complexe  
Arp2/3 et mécanismes moléculaires de sa régulation**

**Date de soutenance :** 19 septembre 2014

**Directeur de thèse :** Alexis GAUTREAU

LEBS (Gif-Sur-Yvette)

**Devant le jury composé de :**

*Président du jury*  
*Rapporteurs*

Simon SAULE

Loïc DUPRE

Ali BADACHE

*Examineurs*

Philippe CHAVRIER

Maria Carla PARRINI

Institut Curie (Orsay), Université Paris Sud

CPTP, Université Toulouse III

CRCM, Aix-Marseille Université

Institut Curie (Paris)

Institut Curie (Paris)

# Sommaire

<b>Liste d'abréviations .....</b>	<b>5</b>
-----------------------------------	----------

<b>– Première partie – Introduction .....</b>	<b>2</b>
---	----------

<b>I. La migration cellulaire .....</b>	<b>3</b>
---	----------

1. La migration cellulaire dans les processus physiologiques et pathologiques .....	3
1.1. Rôle fondamental de la migration cellulaire dans les processus physiologiques .....	3
1.2. Conséquences de la dérégulation de la migration cellulaire .....	3
2. Les différents modes de migrations .....	4
2.1. La migration collective .....	5
2.2. La migration mésenchymateuse .....	6
2.3. La migration amiboïde.....	8
2.4. Transition entre migration mésenchymateuse-amiboïde (MAT).....	9
3. Maintien d'une migration cellulaire dirigée.....	11
3.1. La cellule mésenchymateuse est polarisée .....	11
3.2. L'uropode .....	11
3.3. La cellule migre vers un gradient de molécules chimiques : la chimiotaxie .....	12

<b>II. Dynamique de l'actine .....</b>	<b>14</b>
--	-----------

1. La polymérisation de l'actine.....	14
2. La régulation de la dynamique de l'actine .....	15
2.1. Les protéines interagissant avec l'actine .....	15
2.2. Les nucléateurs de l'actine .....	17
3. L'actine au lamellipode .....	19
3.1. L'actine est branchée au lamellipode .....	19
3.2. Dynamique de l'assemblage de l'actine au lamellipode.....	19

<b>III. Le complexe Arp2/3 et ses régulateurs .....</b>	<b>21</b>
---	-----------

1. Le complexe Arp2/3 .....	21
1.1. Fonctions cellulaires du complexe Arp2/3 .....	21
1.2. Caractérisation du complexe Arp2/3 .....	22
1.3. Fonction moléculaire du complexe Arp2/3 .....	22
1.4. Activation du complexe Arp2/3.....	23
2. Les activateurs du complexe Arp2/3: les NPFs .....	26
2.1. WASP et N-WASP .....	28

2.2. Le complexe WAVE .....	30
2.3. WASH .....	35
2.4. WHAMM/JMY .....	39
3. Les inhibiteurs du complexe Arp2/3 .....	41
3.1. Les Coronines .....	41
3.2. PICK1 .....	42
3.3. Gadkin .....	44
4. Les régulateurs de la branche.....	45
4.1. La Cortactine .....	45
4.2. GMF .....	47
5. Les nouveaux régulateurs et les fonctions atypiques du complexe Arp2/3 .....	48
5.1. SPIN90 .....	48
5.2. Un complexe Arp2/3 hybride aux sites d'adhésions .....	49

## ***Objectif de la thèse .....*** 51

## ***– Deuxième partie – Résultats .....*** 52

<b>I Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration (2013) <i>Nature</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>II Arpin is not essential for chemotaxis .....</b>	<b>54</b>
<b>III Tankyrase interagit avec Arpin .....</b>	<b>59</b>

## ***– Troisième partie – Discussion.....*** 79

<b>1. Arpin contrôle la migration cellulaire .....</b>	<b>80</b>
1.1. La régulation de la persistance du lamellipode .....	80
1.2. Arpin contrôle la vitesse et la directionnalité de migration.....	81
1.3. Arpin n'est pas essentielle au processus de chimiotaxie .....	82
1.4. L'activité d'Arpin est régulée dans la cellule.....	84
<b>2. Rôles putatives d'Arpin dans les cancers .....</b>	<b>86</b>
2.1. Rôle d'Arpin dans la progression tumorale.....	86
2.2. Arpin contrôle la transition entre les modes de migration .....	87
2.3. Rôle d'Arpin dans le contrôle de la prolifération cellulaire .....	89



<b><i>Annexes</i></b> .....	<b>92</b>
-----------------------------	-----------

Dang, I & Gautreau, A. (2012) <i>Bioessays</i> .....	93
--	----

Gorelik R, Dang I, Gautreau A. (2014) <i>Medecine Sciences</i> .....	94
--	----

Boudoukha S., <i>et al</i> (2014) <i>FEBS Letter</i> .....	95
--	----

<b><i>Références</i></b> .....	<b>96</b>
--------------------------------	-----------

<b><i>Remerciements</i></b> .....	<b>115</b>
-----------------------------------	------------

# Liste d'abréviations

<b>ADF</b>	Actin Depolymerization Factor
<b>Arp</b>	Actin Related Protein
<b>BAR</b>	Bin-Amphisin-Rvs
<b>CRIB</b>	Cdc42 Rac Interactive Binding domain
<b>ECM</b>	Extracellular Matrice
<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal Transition
<b>GBD</b>	GTPase Binding Domain
<b>GEF</b>	Guanine Exchange Factor
<b>GMF</b>	Glia Maturation Factor
<b>JMY</b>	Junction-Mediating and regulatory protein
<b>MAT</b>	Mesenchymal-Amoeboïd Transition
<b>MLC</b>	Myosin Light Chain
<b>MTOC</b>	Microtubule organizing center
<b>NPF</b>	Nucleation Promoting Factor
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol (4,5) Diphosphate
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3, 4 5) Triphosphate
<b>PRD</b>	Proline Rich Domain
<b>SCAR</b>	Suppressor of cAR
<b>SH3</b>	Src Homology 3
<b>SHD</b>	SCAR homology domain
<b>WASH</b>	Wiskott-Aldrich Syndrom protein and Scar Homolog
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
<b>WAVE</b>	WASP family Verprolin Homologous Protein
<b>WCA</b>	WH2, Connecting Region, Acidic domain
<b>WH2</b>	WASP Homology domain 2
<b>WHAMM</b>	WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules
<b>WIP</b>	WASP interacting protein
<b>WIRE</b>	WIP-related
<b>WISH</b>	WASP Interacting SH3 protein

– Première partie –

# Introduction

# I. La migration cellulaire

## 1. La migration cellulaire dans les processus physiologiques et pathologiques

### 1.1. Rôle fondamental de la migration cellulaire dans les processus physiologiques

Au cours du développement, la migration cellulaire permet la mise en place des tissus et des organes. Les cellules migrent de manière collective durant le mécanisme de gastrulation qui permet de former les trois feuillets embryonnaires. On retrouve des migrations de cellules individuelles, par exemple les cellules germinales primordiales (PGCs) dont la migration est indispensable à la formation des gonades. Les cellules de la crête neurale sont des cellules de type épithéliales qui constituent la face dorsale du tube neurale. Elles subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui les individualise. Elles acquièrent alors des propriétés de migration pour se disséminer dans l'embryon et se différencier par exemple, en neurones, en cellules pigmentaires, en myoblastes.

D'autre part, la migration cellulaire est essentielle au processus de maintien de l'intégrité de l'organisme comme l'immunité, l'inflammation et la cicatrisation. En présence d'un tissu lésé, les cellules de l'épiderme, notamment les cellules basales et les fibroblastes, migrent afin refermer la blessure. Les cellules immunes jouent aussi un rôle dans le processus d'inflammation sous-jacent à la blessure. Elles sont alors recrutées de la circulation sanguine vers le site d'inflammation suite aux signaux pro-inflammatoires sécrétés par les cellules lésées et par les bactéries infectieuses. A l'inverse, les cellules présentatrices d'antigènes migrent du site d'inflammation vers les organes lymphoïdes pour activer les lymphocytes B et T pour une réponse immunitaire spécifique. La migration cellulaire est au centre des processus essentiels d'immunité et d'homéostasie. Une anomalie des mécanismes de la migration cellulaire est délétère pour l'organisme et souvent létale, ou associée à des pathologies sévères.

### 1.2. Conséquences de la dérégulation de la migration cellulaire

#### 1.2.1. Pathologies liées à un défaut de migration dans les processus physiologiques

A toutes les étapes du développement, un défaut de migration engendre des malformations pouvant entraîner la mort précoce de l'embryon ou de multiples syndromes, incluant les troubles

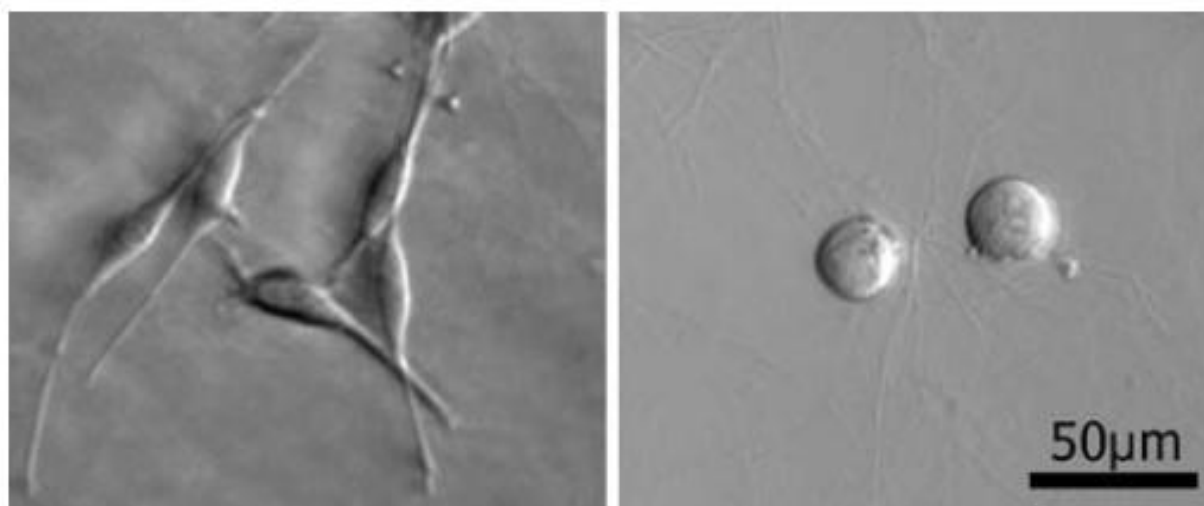
neurologiques, maladies cardiaques congénitales, des retards physiques et mentaux (Kurosaka and Kashina, 2008). Dans les processus d'immunités, un défaut de migration peut entraîner des pathologies graves comme l'immunodépression, des maladies auto-immunes ou encore un défaut de cicatrisation. De plus, une migration dérégulée peut entraîner des syndromes d'inflammations chroniques (par exemple : asthme, psoriasis, arthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, scléroses multiples). Dans ces cas là, les cellules immunes migrent et s'activent dans des tissus inappropriés provoquant une destruction du tissu (Mackay, 2008). Dans tous les cas, ces pathologies sont dues à la déficience de protéines impliquées dans la migration cellulaire et en particulier les protéines du cytosquelette d'actine, les protéines d'adhésions, les récepteurs des chimio-attractants (Kurosaka and Kashina, 2008; Mackay, 2008).

### **1.2.2. La migration dans le processus d'invasion**

En dehors des processus physiologiques sains, la migration cellulaire peut être réactivée dans des cellules normalement non motiles, par exemple les cellules épithéliales au cours du processus de tumorigénèse. La cellule épithéliale subit une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui est considérée comme un évènement clé dans le processus tumorale : la cellule s'individualise et adopte les caractéristiques d'une cellule mésenchymale (Thiery, 2002). Les mécanismes de migration cellulaire ainsi réactivés dans la cellule tumorale, lui confère sa capacité à envahir l'organisme pour former des métastases. De nombreuses études montrent que les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine sont très régulièrement cibles de surexpressions, entraînant une augmentation de l'invasivité tumorale (Gross, 2013; Nurnberg et al., 2011; Wang et al., 2005).

## **2. Les différents modes de migrations**

A l'origine, les différents modes de migration ont été classés en fonction de la morphologie des cellules en migration. La classification a ensuite été élargie en prenant en compte des paramètres moléculaires, comme l'organisation du cytosquelette d'actine, le type d'interaction avec la matrice extracellulaire (ECM) et la modification de la structure du tissu dans lequel la cellule migre. On distingue la migration collective et la migration individuelle comprenant la migration mésenchymateuse et la migration amiboïde (Figure1).



**Figure 1. Différences morphologiques entre cellules mésenchymateuses et amiboïdes.** Images en contraste de phase de lignées de cellules de sarcome K4 (gauche) de type mésenchymateuses et A3 (droite) de type amiboïdes. Extrait de (Pankova et al., 2010).

## 2.1. La migration collective

La migration collective est caractérisée par la migration coordonnée d'un ensemble de cellules maintenues entre elles par des jonctions cellules-cellules. Ce mode de migration est retrouvé au cours de la morphogénèse, de l'organogénèse, de la réparation tissulaire et également au cours de l'invasion tumorale. La migration collective assure une distribution des cellules pour la formation et le remodelage tissulaire, ou encore pour permettre le transport de cellules immobiles. Suivant le contexte, les cellules migrent collectivement en monocouches ou en multicouches sur une surface en deux dimensions. En trois dimensions, les multicouches peuvent s'organiser de manière à former une lumière interne en définissant une polarité baso-latérale, par exemple lors de la formation de glandes ou lors de l'angiogénèse (Friedl and Gilmour, 2009). D'autre part, les cellules peuvent aussi migrer en petits groupes de cellules comme par exemple les cellules de bordures chez la *Drosophile* qui migrent vers l'ovocyte et participent à la fertilisation de l'œuf.

Pour migrer de manière efficace, les cellules s'organisent en entité unique ce qui implique la cohésion entre les cellules, une activité du cytosquelette coordonnée et une polarisation collective. La cohésion cellules-cellules est médiée par les protéines des jonctions adhérentes comme les cadhérines qui sont directement ou indirectement connectées au cytosquelette sous-jacent des cellules. L'organisation « supra-cellulaire » du cytosquelette des cellules est répartie entre les différentes cellules en fonction de leur position dans le groupe et permet de générer un mouvement coordonné en réponse à des signaux tels que les chimiokines, les facteurs de croissances, ou les protéines constituant la matrice extracellulaire. L'ensemble des cellules migrent de façon polarisé et est caractérisé par la présence au front de migration de cellules aux propriétés particulières appelées cellules « meneuses »

qui guident les « suiveuses ». Les cellules meneuses ont la particularité d'avoir une activité protrusive élevée et des propriétés adhésives au substrat développées pour tracter les cellules suiveuses.

Ensemble, ces processus constituent un système cellulaire robuste de remodelage tissulaire. Ultérieurement et dans certains cas, certaines cellules quittent le groupe à un moment donné et s'individualisent en cellules mésenchymateuses. On observe ce phénomène lorsque les cellules de la crête neurale se détachent du tube neural au cours du processus de délamination, ou encore lors de l'individualisation de cellules tumorales qui s'échappent de la tumeur primaire.

## **2.2. La migration mésenchymateuse**

### **2.2.1. Caractéristiques de la migration mésenchymateuse**

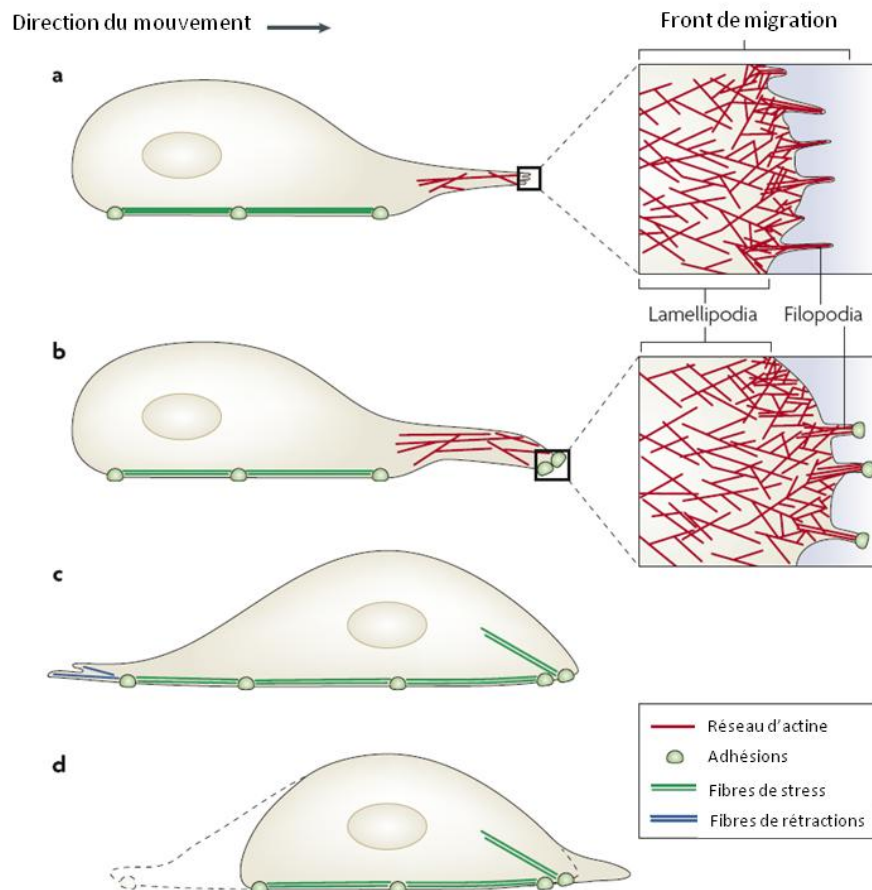
La migration mésenchymateuse se réfère à la migration des fibroblastes. Ce mode de migration constitue le mode le plus commun de migration cellulaire. Dans la migration mésenchymateuse la cellule adopte une forme allongée (Figure 1) et polarisée qui est dépendante d'interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire. Pour traverser les tissus, les cellules dégradent la matrice via la sécrétion de protéases au front de migration de la cellule. Ainsi, du fait de la nécessité de former des contacts focaux, les cellules mésenchymateuses migrent à plutôt faibles allures (0.1-2 $\mu$ m/min) (Ballestrem et al., 2001; Petroll and Ma, 2003; Zamir et al., 2000).

#### **2.2.1. Le lamellipode**

Les cellules mésenchymateuses migrent grâce l'extension de sa membrane plasmique grâce à la polymérisation d'actine au front de migration. Cette extension est appelée le « lamellipode » lorsque la cellule migre sur surface en deux dimensions et « pseudopode » sur une surface à trois dimensions. Dans les deux cas, les mêmes machineries moléculaires sont impliquées. Il n'est cependant pas rare de retrouver d'autres types de protrusions au front d'une même cellule comme les filopodes (Nobes and Hall, 1995) mais ces derniers jouent plutôt un rôle de senseur de l'environnement (Mattila and Lappalainen, 2008).

Sur une surface à deux dimensions, la migration mésenchymateuse est générée par un processus composé d'étapes successives qui se coordonnent de manière cyclique (Sheetz et al., 1999). Ce mécanisme est initié par la déformation de la membrane plasmique qui est projetée dans la direction du mouvement, qui s'étend et forme le lamellipode. Dans un deuxième temps des complexes d'adhésions se forment pour maintenir le lamellipode nouvellement formé sur le substrat. S'en suit un détachement des contacts d'adhésions et une rétraction de l'arrière de la cellule grâce à la contraction du système actine-myosine (Figure 2). Au niveau moléculaire, la voie de signalisation activée lors de la migration de type mésenchymateuse implique l'activation de la petite GTPase Rac qui induit la

polymérisation d'actine au front de migration de la cellule. Le mécanisme moléculaire détaillé sera développé plus extensivement dans la partie II.



**Figure 2. La migration cellulaire mésenchymateuse est dépendante de différentes structures de filaments d'actine.** a, La migration est initiée par la protrusion du lamellipode au front de migration, via la génération d'un réseau d'actine. b, Le lamellipode adhère au substrat. c, Le corps cellulaire est transloqué vers l'avant via la contraction du système actine-myosine et les fibres de stress. d, Les points d'adhésions se détachent du substrat à l'arrière et la cellule se rétracte. Adapté de (Mattila and Lappalainen, 2008)



## 2.3. La migration amiboïde

### 2.3.1. Caractéristiques de la migration amiboïde

Les cellules « amiboïdes », du terme grec *amoibê* (« échange »), sont caractérisées par des modifications fréquentes de sa forme. Cependant, l'amalgame entre « cellule amiboïde » et « migration amiboïde » est fréquemment utilisé et peut porter à confusion. En effet, une cellule amiboïde peut migrer en présentant des caractéristiques de la migration mésenchymateuse: par exemple, les cellules amiboïdes comme l'amibe *Dictyostelium discoideum* ou les leucocytes, migrent via l'extension de lamellipodes ou pseudopodes. Les cellules souches hématopoïétiques et les cellules primordiales germinales (PGCs) présentent quant à elle une migration de type amiboïde caractéristique (Blaser et al., 2006).

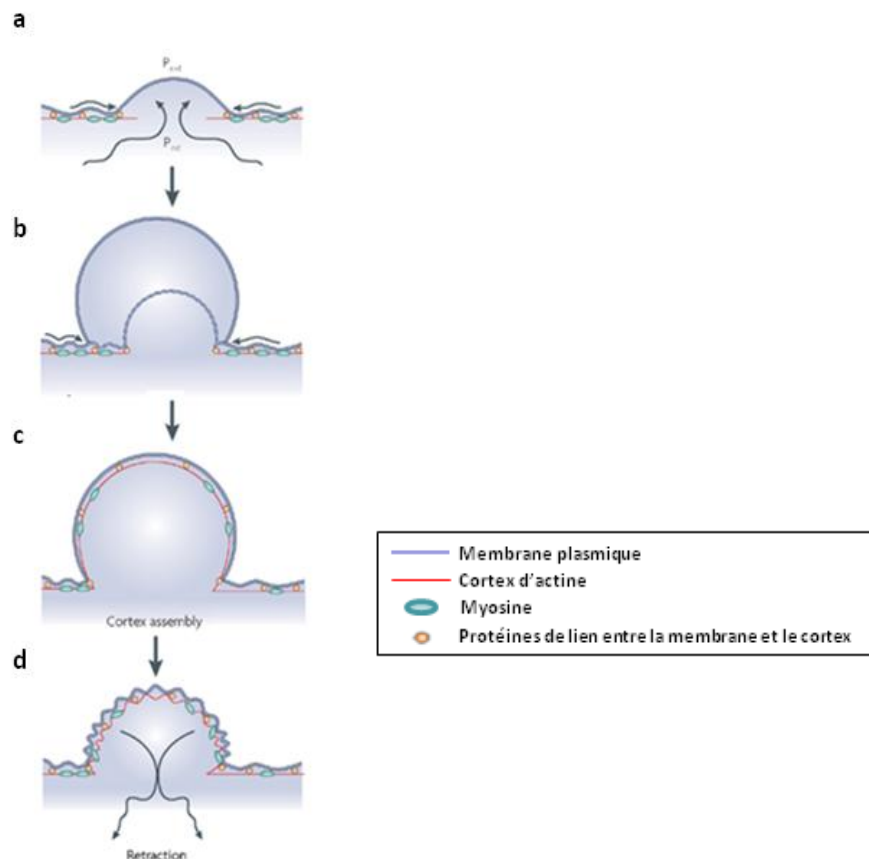
La migration amiboïde est caractérisée par la forme arrondie de la cellule (Figure 1) qui est maintenue grâce à une forte contractilité cellulaire. Dans ce type de migration, la cellule interagit très faiblement avec le substrat et nécessite peu l'action de protéases pour dégrader la matrice. En effet la cellule se déforme et se faufile entre les fibres de la matrice (Friedl and Wolf, 2003). Par conséquent, la capacité à se déformer et les contacts focaux réduits font que la cellule migre à une vitesse extrêmement rapide (2-30µm/min) (Friedl et al., 1998).

Le mécanisme de la migration amiboïde dépend de l'environnement dans lequel la cellule se trouve. Dans le cas où la cellule peut former des contacts cellules-cellules ou cellule-ECM suffisants, l'adhésion établie à l'avant de la cellule tracte l'arrière via le déplacement du cytoplasme vers l'avant. Dans le cas de faibles adhésions possibles avec la matrice extracellulaire, la cellule n'est capable de migrer que lorsqu'elle se trouve dans un milieu confiné, en exerçant une pression de part et d'autre des parois pour induire un mouvement vers l'avant (Hawkins et al., 2009; Hawkins et al., 2011; Lammermann et al., 2008; Malawista et al., 2000).

### 2.3.2. Le bleb

Dans la migration de type amiboïde, les blebs sont des protrusions fréquemment retrouvées (Friedl and Wolf, 2009). La membrane plasmique de toutes les cellules eucaryotes est fortement liée au cortex cellulaire contenant de l'actine et de la myosine. Dans la cellule amiboïde, le cortex et en particulier la myosine, maintient la membrane plasmique sous tension et exerce une pression hydrostatique intracellulaire pour maintenir la forme arrondie de la cellule. A un moment donné, la membrane plasmique se sépare temporairement et localement du cortex (Keller and Eggli, 1998; Paluch et al., 2005) permettant au cytoplasme sous pression de s'engouffrer dans la brèche et de former une protrusion sphérique de membrane appelée bleb. Le cortex se reforme ensuite à l'intérieur du bleb et entraîne sa rétraction (Figure 3).

La dynamique d'actine requise pour la migration de type amiboïde nécessite l'activation de la petite GTPase RhoA, et de son effecteur ROCK (« rho-associated protein kinase »). ROCK induit la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC2) (Worthylake et al., 2001). La voie Rho est donc responsable de la contractilité générant le bleb.



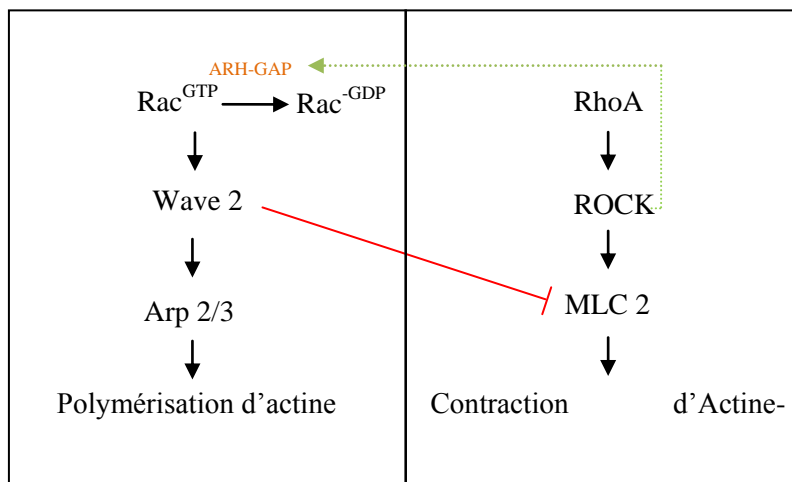
**Figure 3. La formation d'un bleb.** a, Le bleb est initié par la rupture locale du cortex d'actine. b, La pression hydrostatique du cytoplasme propulse le fluide cytoplasmique dans la brèche et génère une extension de membrane exempt de cortex. c, L'expansion du bleb ralentit et le cortex se reforme sous la membrane du bleb. d, La myosine est recrutée au cortex nouvellement formé et entraîne la rétraction du bleb.

## 2.4. Transition entre migration mésenchymateuse-amiboïde (MAT)

Certains types de cellules peuvent alterner entre les différents modes de migration. Cependant, chaque mode de migration semble être mutuellement exclusifs (Bergert et al., 2012). En effet, la pression hydrostatique requise pour la formation de blebs, ne permet pas à la cellule de générer un lamellipode via la polymérisation d'actine et réciproquement. De manière simplifiée, on associera migration mésenchymateuse à lamellipode et amiboïde à bleb. Cette transition mésenchymateuse-amiboïde (MAT) peut être définitive: par exemple, le monocyte utilise la migration amiboïde mais, une fois différencié en macrophage, il adopte un mode de migration mésenchymateux avec la réexpression d'intégrines et la réorganisation de son cytosquelette (Akimov and Belkin, 2001; Ammon et al., 2000). Dans d'autres cas, les cellules peuvent alterner entre les deux modes de migration

rapidement et de façon transitoire. Ce mécanisme, permettrait aux cellules d'optimiser leur mode de migration afin de se déplacer efficacement en réponse à un changement d'environnement. Par exemple durant la surveillance immunitaire et la réponse inflammatoire, les leucocytes migrent à travers différents environnements comme le sang, le mucus, les cellules épithéliales. C'est également le cas pour les cellules tumorales invasives lors du processus d'invasion. Outre les changements d'environnements, la transition entre les deux modes de migration dans les cellules cancéreuses explique la résistance contre des molécules thérapeutiques ciblant les protéases requises pour la migration mésenchymateuse. Les cellules tumorales transiteraient alors vers la migration de type amiboïde pour contourner l'effet de la drogue (Wolf et al., 2003).

*In vitro*, l'utilisation d'inhibiteur de protéases, la sur-activation de la voie Rho, ou la diminution des interactions intégrines-ECM favorisent la migration de type amiboïde (Sahai and Marshall, 2003; Wolf et al., 2003). Le lien moléculaire entre les deux modes de migration a été identifié et montre que les voies Rho et Rac sont antagonistes: WAVE2, un effecteur de Rac, inhibe la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine 2 (MLC-2) nécessaire pour la migration amiboïde. De l'autre côté ROCK, peut activer indirectement un régulateur négatif de Rac, ARHGAP22, ce qui inhibe la migration mésenchymateuse via la l'échange du GTP vers le GDP sur Rac (Sanz-Moreno et al., 2008) (Figure 4).



**Figure 4. Les voies Rac et Rho sont antagonistes.** Les migrations mésenchymateuses et amiboïdes sont mutuellement exclusives. Ceci s'explique par le fait que WAVE, un effecteur de la voie Rac qui induit la migration mésenchymateuse, inhibe la chaîne légère de la myosine (MLC-2) qui est nécessaire à la migration amiboïde. Réciproquement, ROCK, l'effecteur de la voie RhoA active un régulateur négatif de la voie Rac, ARH-GAP. Adapté de (Sanz-Moreno and Marshall, 2010)

### 3. Maintien d'une migration cellulaire dirigée

Intrinsèquement, la cellule est capable de se polariser, c'est-à-dire de définir l'avant et l'arrière de la cellule pour aboutir à une migration directionnelle. Cependant, l'environnement extracellulaire peut influencer la migration, par exemple des paramètres physiques tels que la densité du substrat (haptotaxie), la rigidité du substrat (durotaxie), le champ électrique (electrotaxie), la composition de la matrice extracellulaire mais aussi des paramètres chimiques médiés par des molécules chimio-attractantes (chimiotaxie).

#### 3.1. La cellule mésenchymateuse est polarisée

La cellule mésenchymateuse migre de manière polarisée. De façon simplifiée, le signal induisant la polymérisation d'actine au front de migration induit l'accumulation de la kinase PI3K (« phosphatidylinositol-kinase de type 3 »)(Kolsch et al., 2008). A la membrane plasmique, PI3K phosphoryle les phospholipides membranaires PIP2 (Phosphatidylinositol (4,5) Diphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol (3, 4 5) Triphosphate). PIP3 recrute localement Rac qui est activé par des GEF (« guanine nucleotide exchange factor ») sous forme Rac-GTP (Cote and Vuori, 2007; Rossman et al., 2005). Une boucle de rétroaction positive entre Rac et PIP3 a été rapportée et semble importante pour maintenir la localisation polarisée de PIP3 et permettre l'activation constante de Rac au front de la cellule en migration (Weiner et al., 2002). Rac-GTP permet ensuite de recruter le complexe WAVE à la membrane plasmique, qui va ensuite initier la formation du réseau d'actine branchée via le complexe Arp2/3 (voir partie III) : le lamellipode se forme.

Le front de migration est par conséquent fortement lié à l'activité de Rac, et la découverte récente d'une forme photo-activable de Rac a montré de façon élégante que l'augmentation de l'activité de Rac au lamellipode était suffisante pour maintenir la polarité et la migration directionnelle de la cellule (Rorth, 2011; Wang et al., 2010; Wu et al., 2009). A l'arrière, la GTPase RhoA est activée et favorise l'activité de la myosine (Wong et al., 2006) tandis que la phosphatase PTEN (« Phosphatase and tensin deleted on chromosome 10 ») maintient un taux élevé de PIP2 (Funamoto et al., 2002; Iijima and Devreotes, 2002).

#### 3.2. L'uropode

L'uropode est une extension de membrane plasmique localisée de manière opposée au front de migration. Il est concentré en organelles spécifiques, tels que le centre organisateur des microtubules (MTOC), l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique; en récepteurs de signalisations comme les intégrines; en protéines du cytosquelette et d'adhésions, en particulier la myosine II ainsi que les protéines de la famille des ERM (ezrin-radixin-moesin) qui constituent un lien entre la membrane plasmique et le cortex d'actine sous-jacent (Sanchez-Madrid and Serrador, 2009).

De nombreuses cellules migrent de manière polarisée en présentant un uropode à l'arrière et en particulier les cellules amiboïdes comme *Dictyostelium discoideum* ou les leucocytes chez les vertébrés (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). Des études récentes ont également retrouvé des structures non-protrusives mais proches en composition des uropodes dans les lignées tumorales de mélanomes ou de cancer du sein (Lorentzen et al., 2010; Poincloux et al., 2011).

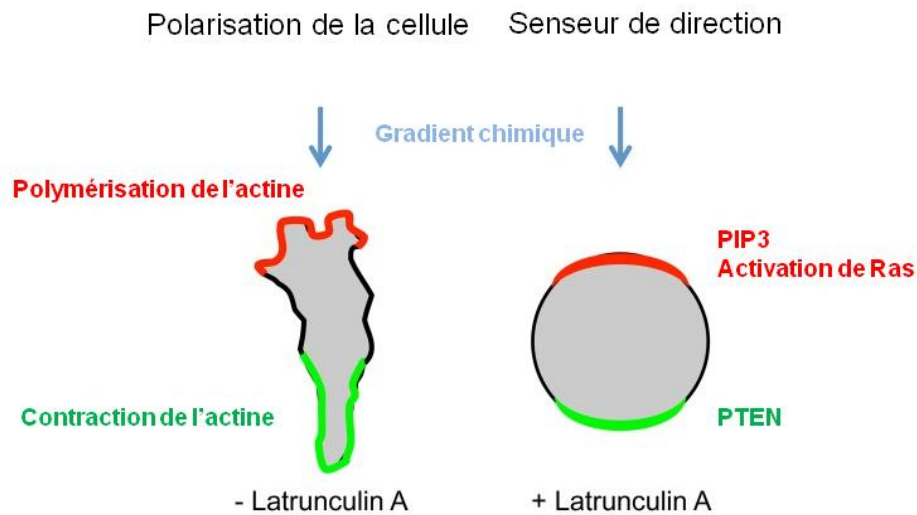
Le rôle précis de la régulation de la migration cellulaire par l'uropode n'est pas encore bien connu. Chez les leucocytes, l'enrichissement en myosine II empêcherait l'adhésion au substrat et favoriserait la dé-adhésion d'intégrines à l'arrière de la cellule pour promouvoir la migration de la cellule (Morin et al., 2008; Smith et al., 2003; Worthylake et al., 2001). D'autre part, des études suggèrent que, via l'enrichissement de protéines de la famille des ERM, le cortex d'actine est maintenu rigide prévenant sa rupture et la formation d'un bleb à l'arrière. Une fois la protrusion générée au front de migration, la rétraction de l'uropode à l'arrière est médiée par l'accumulation de myosine II (Poincloux et al., 2011). Ce mécanisme permettrait de maintenir la migration dirigée d'une cellule amiboïde (Lorentzen et al., 2010).

### **3.3. La cellule migre vers un gradient de molécules chimiques : la chimiotaxie**

La chimiotaxie est indispensable dans tous les processus qui requièrent une migration ciblée de la cellule. Pour assurer une chimiotaxie efficace, deux mécanismes sont requis: la polarisation de la cellule et un système senseur de direction (Figure 5). La polarisation morphologique de la cellule permet de maintenir une polymérisation d'actine plus active au lamellipode qu'à l'arrière de la cellule et augmente la réactivité au chimio-attractant à l'avant de la cellule. Le mécanisme de senseur de direction est indépendant de la dynamique de l'actine et permet de réagir efficacement au gradient grâce à la polarisation des molécules senseurs dans la direction du gradient, en particulier Ras (activateur des petites GTPases Rac, Rho, Cdc42) et PIP3. Par conséquent ces mécanismes peuvent être découplés. L'utilisation de la Latrunculin A, qui inhibe la polymérisation d'actine, fait perdre la forme polarisée des cellules, mais elles peuvent toujours réorienter les molécules senseurs dans le sens du gradient (Senoo and Iijima, 2013). Cependant, la manière dont la cellule contrôle spatialement et temporellement ces différents mécanismes reste encore inconnue. Des études récentes menées chez l'amibe *Dictyostelium* ont montré que Rac joue un rôle important dans le contrôle spatial des molécules senseurs Ras et PIP3 (Wang et al., 2013).

Malgré les nombreuses études focalisées sur le rôle du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire et dans la chimiotaxie, les microtubules ont aussi une place importante. Très tôt, des études ont montré que l'utilisation de drogues déstabilisant la dynamique des microtubules perturbait la migration de fibroblastes (Liao et al., 1995; Vasiliev et al., 1970). Plus tard, on a compris que les microtubules étaient impliqués dans de nombreuses fonctions relatives à la migration cellulaire telles

que le recyclage des complexes d'adhésions, l'activation des petites GTPases Rac ou Rho et le transport de vésicules au front de migration (Kaverina and Straube, 2011). Récemment des études ont également montré l'importance des microtubules dans la chimiotaxie: la stabilisation des microtubules au front de migration de la cellule permettrait de maintenir une migration cellulaire dirigée en réponse à un chimio-attractant (Benseddik et al., 2013; Daou et al., 2013).



**Figure 5. Les deux mécanismes assurant une chimiotaxie efficace.** En réponse à un gradient chimique, la cellule adopte une morphologie polarisée grâce à la polymérisation d'actine vers le sens du gradient et une contractilité à l'arrière. Sous l'effet de la latrunculin A qui inhibe la polymérisation d'actine, la cellule n'est plus polarisée mais les molécules senseurs de direction comme Ras et PIP3 restent orientés vers le sens du gradient, tandis la phosphatase PTEN est localisé à l'« arrière » de la cellule. **Adapté de (Senoo and Iijima, 2013)**

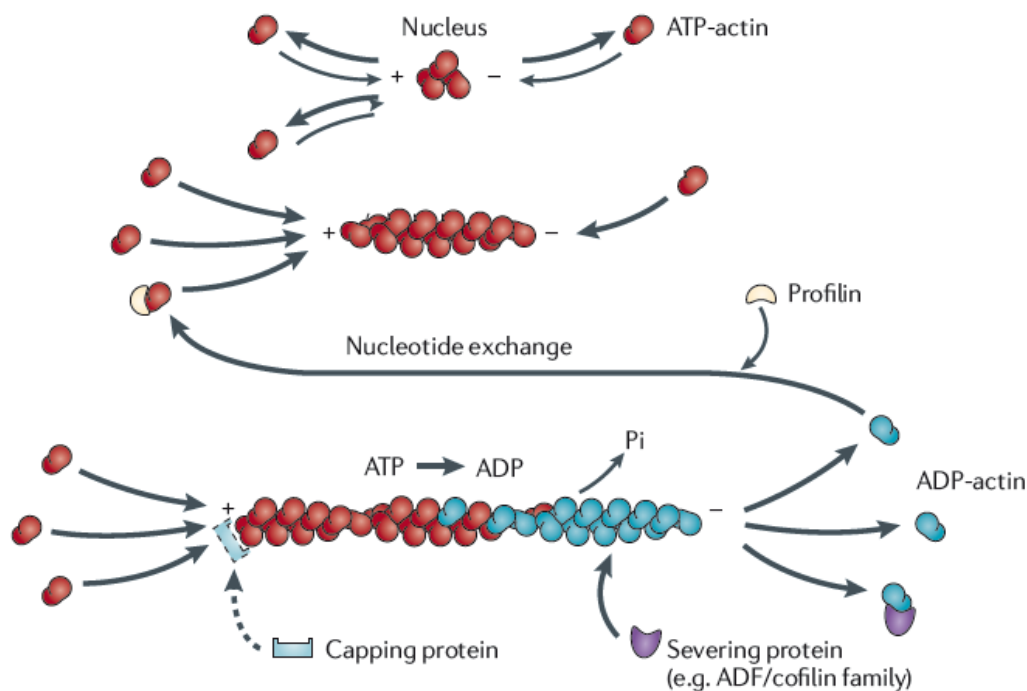
## II. Dynamique de l'actine

L'assemblage des filaments d'actine génère la force nécessaire qui contribue à une migration cellulaire efficace. Les études biochimiques de reconstitution ont révélé la nécessité d'un nombre réduit de protéines nécessaires et suffisantes pour générer un mouvement comparable à ce qui est retrouvé *in vivo* (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Loisel et al., 1999; Pollard and Borisy, 2003). Ces protéines critiques possèdent des activités diverses qui contribuent au maintien de la protrusion telles que des activités de polymérisation, de dépolymérisation, de coiffage des extrémités des filaments ou encore de sectionnement des filaments.

### 1. La polymérisation de l'actine

L'actine est une protéine globulaire (actine-G) monomérique de 42kDa qui se lie à l'ADP ou à l'ATP. Cette protéine est très conservée au cours de l'évolution et elle est exprimée de manière abondante dans toutes les cellules eucaryotes. *In vitro*, l'actine-G est capable de polymériser et de former un filament (actine-F) composé de deux hélices enroulées (Bugyi and Carlier, 2010; Holmes et al., 1990).

L'initiation de la réaction de polymérisation est très lente, due à l'instabilité des dimères d'actine et de l'affinité très faible entre les monomères d'actines. L'addition d'un troisième monomère permet de stabiliser un noyau trimérique. Cette réaction appelée nucléation enclenche le départ de l'élongation du filament. Ce filament d'actine est polarisé: l'actine liée à l'ATP est polymérisée à l'extrémité plus (+) ou bout barbé et elle est dépolymérisée sous forme d'actine-ADP à l'extrémité moins (-) ou bout pointu (Bugyi and Carlier, 2010; Pollard and Cooper, 2009). Ce mécanisme est appelé « treadmilling » ou « tapis roulant » (Figure 6) et se traduit par une association nette d'actine-G/ATP à l'extrémité barbée compensée par une dissociation nette d'actine-G/ADP à l'extrémité pointue. Le filament d'actine s'allonge lorsque la vitesse de polymérisation au bout barbé est plus rapide que la vitesse de dépolymérisation au bout pointu.



**Figure 6. La nucléation, l'élongation et le recyclage de l'actine.** La polymérisation de l'actine est initiée dès lors que trois monomères d'actine-G/ATP s'assemblent dans un noyau (nucleus). L'élongation du filament se fait via l'addition de monomère d'actine-G/ATP à l'extrémité (+). L'actine dépolymérise à l'extrémité (-) et libère des monomères d'actine-G/ADP. La dynamique d'assemblage du filament est régulée par de nombreuses protéines dont les protéines de coiffes (« capping protein ») qui bloquent les filaments, les protéines qui coupent les filaments comme l'ADF/cofiline et aussi la profiline qui favorise l'échange de l'ADP en ATP sur les monomères d'actines. Extrait de (Nurnberg et al., 2011)

## 2. La régulation de la dynamique de l'actine

### 2.1. Les protéines interagissant avec l'actine

Dans la cellule, la dynamique de l'actine est régulée par des mécanismes complexes impliquant des centaines de protéines jouant des rôles distincts. Ces protéines assurent le contrôle de la longueur des filaments d'actine, leur renouvellement, leur vitesse d'élongation et leur assemblage. On peut citer les grandes classes de protéines telles que la profiline qui polarise la polymérisation de l'actine vers le bout barbé, les protéines de la famille des ADF/cofiline s'associent aux filaments d'actine liés à l'ADP et les coupent ainsi que les protéines de coiffes qui se lient aux bouts barbés et empêchent l'élongation des filaments (Figure 6).



### 2.1.1. La profiline

Dans la cellule, l'actine monomérique n'est pas libre dans le cytoplasme mais associée à des protéines comme la profiline avec une stoechiométrie de 1:1. La profiline est une protéine essentielle dans les processus de migration chez les organismes pluricellulaires. Sa déplétion abolie complètement la formation de lamellipodes dans les cellules de *Drosophila* (Rogers et al., 2003).

La profiline interagit avec la face barbée d'un monomère d'actine, préférentiellement lié à l'ATP et empêche alors sa nucléation spontanée et la formation du trimère (Pollard and Cooper, 1984). De ce fait, seule la face pointue de l'actine-G est libre ce qui oriente la polymérisation de l'actine à l'extrémité barbée du filament d'actine. Enfin, la profiline se dissocie après l'assemblage du monomère sur le filament (Pollard and Cooper, 1984). D'autre part, la profiline favorise aussi l'échange de l'ADP en ATP sur le monomère d'actine (Mockrin and Korn, 1980; Vinson et al., 1998). Elle permet donc un recyclage rapide des monomères d'actines qui seront à nouveau disponibles pour être polymérisés (Figure 6).

### 2.1.2. ADF/cofiline

La famille des ADFs (« Actin Depolymerizing Factor ») aussi appelée cofiline est une famille de protéines fortement conservées. Elles sont impliquées dans la cytokinèse, dans la formation du lamellipode (Rogers et al., 2003) ou encore dans l'endocytose.

La cofiline décore les filaments d'actine « agés » liés à l'ADP. Ainsi, on la retrouve dans des zones légèrement en amont de la zone de polymérisation (Okreglak and Drubin, 2007). L'interaction de la cofiline sur le filament d'actine induirait une torsion du filament (McGough et al., 1997) qui augmenterait la dépolymérisation au bout pointu (Carlier et al., 1997) soit induirait une coupure du filament (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Malgré le fait qu'il est clair que la cofiline favorise le recyclage de l'actine (Carlier and Pantaloni, 1997; Loisel et al., 1999; Rosenblatt et al., 1997), la façon dont elle le fait est encore sujet à débats.

### 2.1.3. Les protéines de coiffes

Les protéines de coiffe jouent un rôle important, *in vivo* et *in vitro*. Elles font parties des protéines indispensables à la motilité *in vitro* et jouent un rôle essentiel à la formation des lamellipodes (Loisel et al., 1999; Mejillano et al., 2004). En effet, les protéines de coiffes vont bloquer l'élongation des filaments d'actine à l'arrière du lamellipode pour favoriser et orienter la polymérisation de l'actine vers la membrane plasmique.

La protéine de coiffe (CP) ubiquitaire est l'hétérodimère composé des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Isenberg et al., 1980). D'autres protéines de coiffe existent dans la cellule comme la Twinfiline, Eps8 ou la Gelsoline (Helfer et al., 2006; Hertzog et al., 2010; Zigmond, 2004). Les protéines de coiffes interagissent avec les extrémités barbées des filaments et les empêchent de s'allonger (Isenberg et al., 1980; Wear et al., 2003). La très faible constante de dissociation des protéines de coiffes suggèrent que les filaments restent coiffés. Pour que l'extrémité barbée soit de nouveau libre, les protéines de coiffes nécessitent d'être décoiffées activement, soit le filament est coupé et libère une nouvelle extrémité barbée.

## 2.2. Les nucléateurs de l'actine

Spontanément, l'actine est capable de polymériser seule mais à une vitesse très faible. Comme précisé précédemment, l'étape limitante de la polymérisation d'actine est l'étape de nucléation. Dans la cellule, des protéines appelées nucléateurs, contournent cette étape limitante et favorisent la formation de noyaux stables, seules ou en association avec un activateur.

### 2.2.1. Le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est le premier nucléateur d'actine à avoir été découvert (Machesky et al., 1994) et est très conservé car il est retrouvé chez tous les eucaryotes. Il est constitué de sept protéines dont deux sont apparentées à l'actine (Arp pour « Actin related protein ») et a la particularité d'être le seul nucléateur à générer des réseaux d'actine branchés. Dans la cellule, le complexe est inactif et nécessite d'être activé par un NPF (« nucleation promoting factor »), par exemple N-WASP dans la figure 7. Une fois activé, le complexe Arp2/3 catalyse la polymérisation d'un filament fille à partir d'un filament mère (Chesarone and Goode, 2009) (Figure 7). La structure, le mode d'action et la régulation du complexe Arp2/3 seront plus extensivement développés dans la partie III.

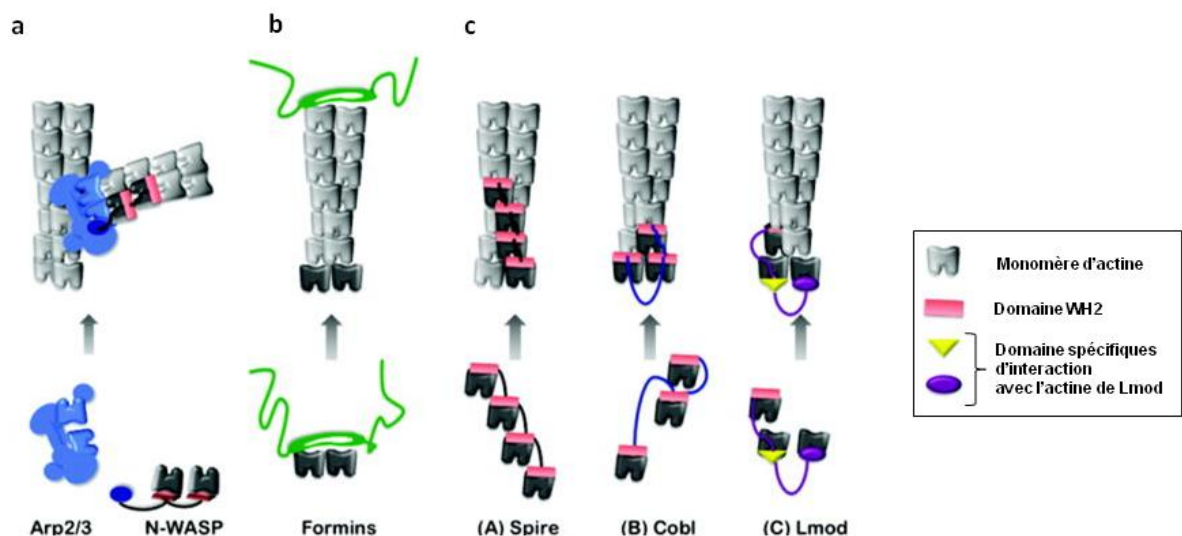
### 2.2.2. Les Formines

Les formines sont impliquées dans la formation des fibres de stress, dans la cytokinèse et dans la formation des filopodes (Goode and Eck, 2007). Les formines nucléent l'actine et agissent en tant que facteurs d'élongation. Elles sont caractérisées par les domaines conservés FH1 et FH2 (« Formin Homology 1 et 2 »). Le domaine FH2 se dimérise en forme de « donuts » et peut ainsi interagir avec l'extrémité barbée de deux monomères d'actine pour les orienter en filament (Otomo et al., 2005; Pring et al., 2003). Cette interaction stabilise le dimère d'actine et permet l'addition de nouveaux monomères d'actine. Le domaine FH1 interagit avec la profiline liée à un monomère d'actine-ATP et permet d'augmenter localement la concentration en monomère d'actine à proximité de FH2 qui peut alors allonger le filament (Figure 7). Contrairement au complexe Arp2/3 qui reste associé à l'extrémité

pointue du filament qu'il a initié, la formine, elle, reste associée à l'extrémité barbée au cours de l'élongation et par conséquent, l'empêche d'être bloquée par une protéine de coiffe.

### 2.2.3. Les nucléateurs à domaines WH2

Les nucléateurs à domaines WH2 sont nombreux. Entre autres, les protéines Spire (Quinlan et al., 2005), Cordon bleu (Cobl) (Ahuja et al., 2007) et Leiomodinn (Lmod) (Chereau et al., 2008) ont la particularité de posséder plusieurs domaines WH2 (4 pour Spire, 3 pour Cobl) qui leur permettent d'interagir avec plusieurs monomères d'actine-G. Lmod contient seulement un domaine WH2, mais compense avec deux autres domaines d'interaction avec l'actine (Chesarone and Goode, 2009). Les mécanismes d'action de ces nucléateurs sont complexes et sans doute différents pour chacun d'entre eux. En rapprochant des molécules d'actine-G, Spire, Cobl et Lmod favorisent la formation de noyau. D'autre part, Spire resterait associée à l'extrémité pointue du filament afin de permettre l'élongation à l'extrémité barbée (Chesarone and Goode, 2009; Quinlan et al., 2005) (Figure 7).

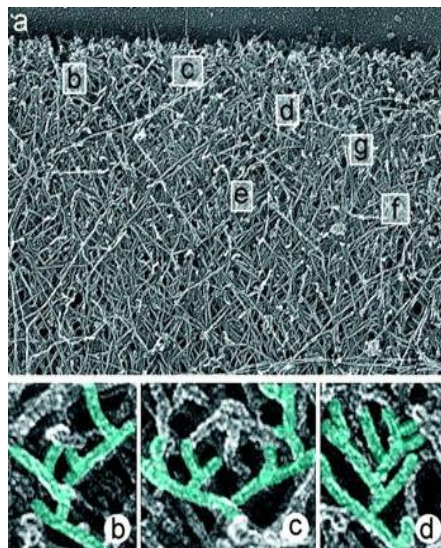


**Figure 7. Mécanismes des différentes classes de nucléateurs de l'actine.** a, Arp2/3 est recruté sur un filament d'actine préexistant et agit simultanément avec son activateur N-WASP. Arp2/3 contient deux sous-unités apparentées à l'actine qui, en addition avec les deux monomères fournis par N-WASP via le domaine WH2, permet de nucléer un nouveau filament. b, La formine se dimérise en forme de « donuts » et serait capable de stabiliser deux monomères d'actine dans le but d'initier l'élongation d'un filament. La formine reste associée à l'extrémité barbée afin de favoriser l'élongation de manière processive. c, Spire, Cobl et Lmod interagissent avec trois ou quatre monomères d'actine via les domaines WH2 ou d'autres domaines spécifiques d'interactions avec l'actine sur Lmod. Ils sont alors capables de former un noyau d'actine stable pour initier l'élongation d'un filament. De (Chesarone and Goode, 2009)

### 3. L'actine au lamellipode

#### 3.1. L'actine est branchée au lamellipode

Au début des années 1970, Michael Abercrombie a observé une fine structure au front de migration de fibroblastes en migration et l'a nommé le « lamellipodium » (Abercrombie et al., 1970). Par microscopie électronique il montre que cette structure est constituée de micro-filaments d'actine mais pas de microtubules (Abercrombie et al., 1971). On sait aujourd'hui qu'effectivement c'est la polymérisation des filaments d'actine à l'avant de la cellule qui est le moteur de la migration cellulaire. Le réseau d'actine formé au front de la cellule est en fait un réseau d'actine branché. Ce réseau a été pour la première fois imagé par microscopie électronique en 1999 (Svitkina and Borisy, 1999) (Figure 8).



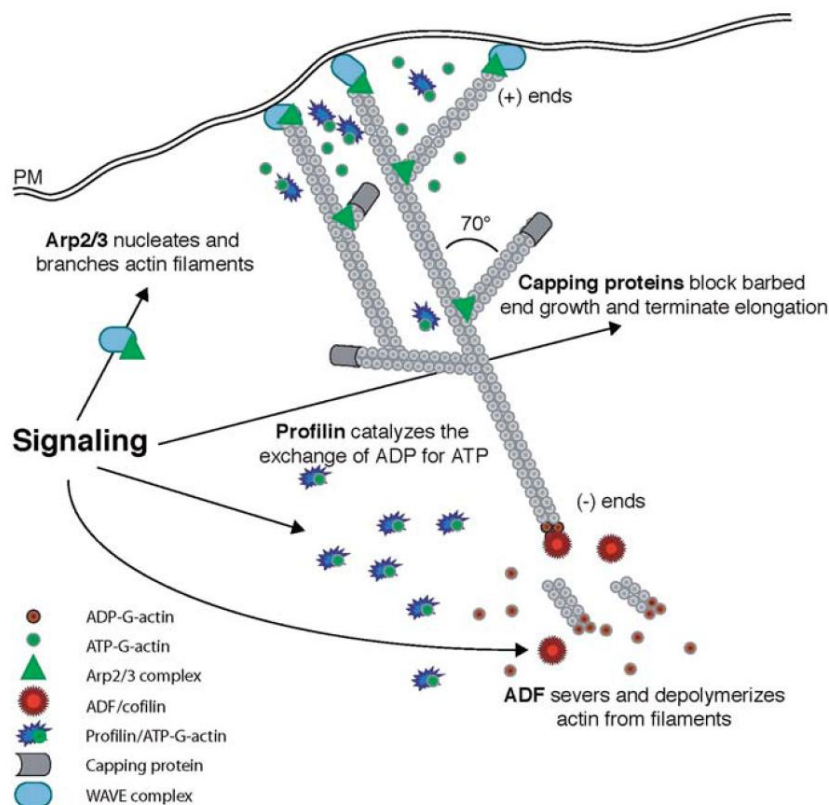
**Figure 8. Les filaments d'actine sont branchés au lamellipode.** Microscopie électronique du lamellipode d'un kératocytes de Xénope qui montre une vue d'ensemble du lamellipode (a) et des régions agrandies (b, c, d) dans lesquelles les filaments branchés sont représentées en couleur (Svitkina and Borisy, 1999)

#### 3.2. Dynamique de l'assemblage de l'actine au lamellipode

Pour générer une protrusion efficace, les protéines doivent se coordonner de manière précise pour maintenir la polymérisation d'actine dirigée dans la direction du mouvement. D'une part, le complexe Arp2/3 est activé localement au niveau du lamellipode par le NPF WAVE. D'autre part, les filaments d'actines sont orientés dans le lamellipode: les extrémités barbées rayonnent et sont polymérisées vers la membrane plasmique tandis que les extrémités pointues sont dépolymérisées à

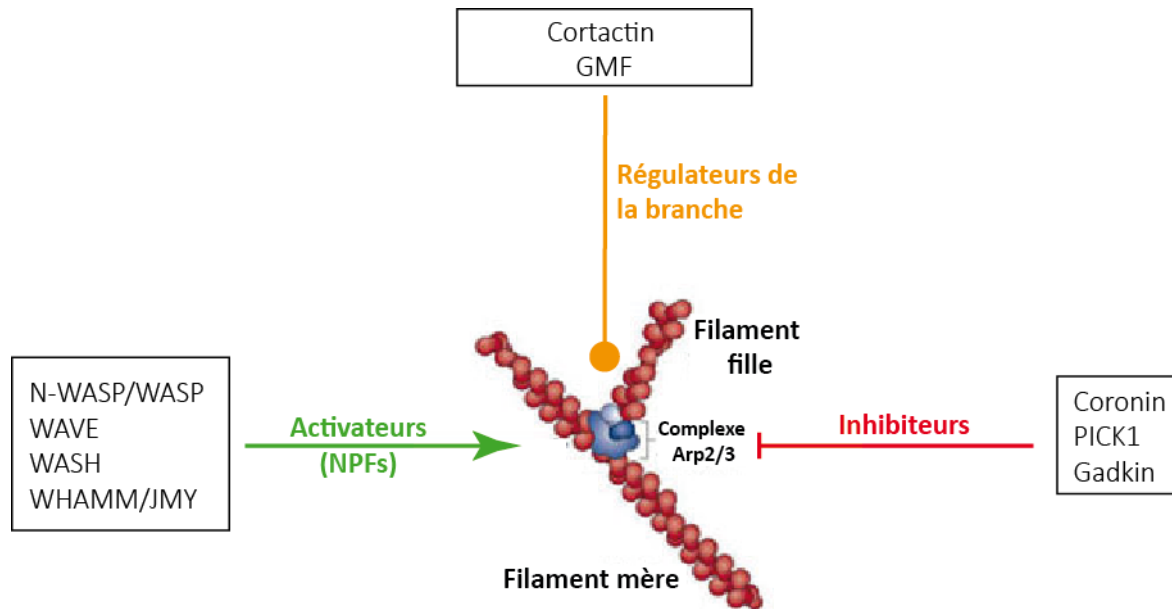
l'arrière du lamellipode. A l'arrière du lamellipode les filaments d'actine sont coiffés ce qui favorise l'élongation au front de migration où les facteurs d'élongation sont aussi enrichis. Enfin, l'adhésion du lamellipode au substrat est absolument nécessaire pour maintenir la protrusion (Giannone et al., 2009).

L'ensemble de ces phénomènes de polymérisation d'actine au lamellipode est appelé « nucléation dendritique » (Mullins et al., 1998) (Figure 9) et caractérise le fait que de nouveaux filaments d'actine émergent de filaments plus âgés au niveau du front de migration de la cellule (Svitkina and Borisy, 1999). Au niveau de la jonction entre les branches des filaments d'actine, les auteurs ont noté la présence du complexe Arp2/3 (Svitkina and Borisy, 1999). Ils ont alors présenté ce complexe comme le meilleur candidat au contrôle de l'assemblage et de l'organisation du réseau d'actine au front de migration de la cellule.



**Figure 9. La nucléation dendritique au lamellipode.** La machinerie de polymérisation d'actine déclenche la nucléation dendritique pour générer une protrusion au front de migration. Le complexe Arp2/3 permet de nucléer des filaments branchés d'actine qui poussent la membrane vers l'avant. Les protéines de coiffe contrôlent la durée de vie des filaments en bloquant les extrémités barbées à l'arrière et favorisent l'élongation des filaments non-coiffés à l'avant du lamellipode. L'ADF/cofilin favorise la dissociation des filaments âgés associés à l'ADP au niveau des extrémités pointues et coupe les filaments préexistants pour générer de nouvelles extrémités barbées. Enfin la profiline interagit avec les monomères d'actine liée à l'ATP et oriente la polymérisation d'actine vers les bouts barbées libres. Extrait de (Disanza et al., 2005)

### III. Le complexe Arp2/3 et ses régulateurs



**Figure 10. Les régulateurs du complexe Arp2/3.** Le complexe Arp2/3, qui génère la formation d'un filament fille à partir d'un filament mère, est régulé par des activateurs, des inhibiteurs et des régulateurs de la branche. Inspiré de (Rotty et al., 2013),

#### 1. Le complexe Arp2/3

##### 1.1. Fonctions cellulaires du complexe Arp2/3

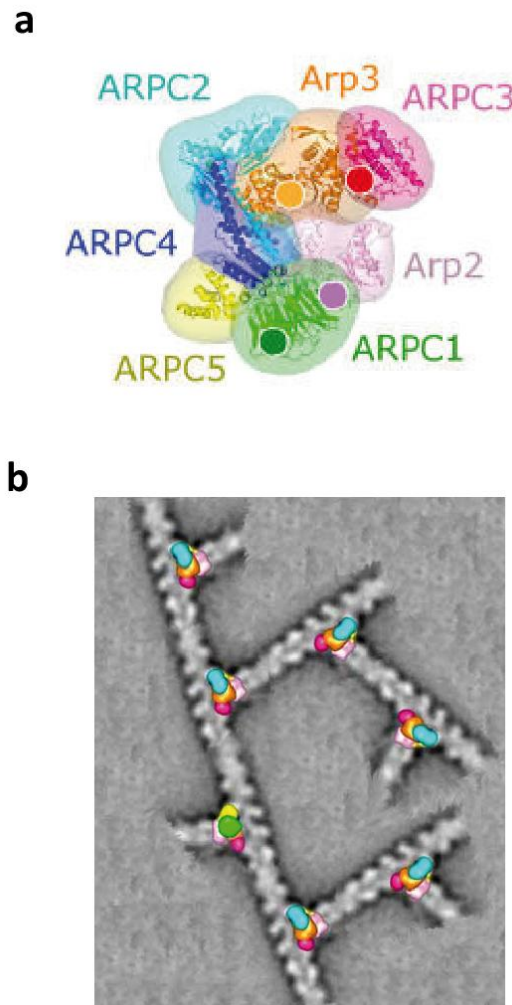
Dans la cellule, l'assemblage d'un réseau d'actine branché généré par le complexe Arp2/3 est requis pour nombreux processus cellulaires. On retrouve le complexe Arp2/3 à de nombreux endroits de la cellule comme au niveau des puits recouverts de clathrine pour l'endocytose, au niveau des endosomes pour leur fission, ou encore au lamellipode pour la migration cellulaire. Il est donc évident que ce processus de polymérisation d'actine branchée soit finement régulé dans la cellule (Figure 10).

## 1.2. Caractérisation du complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 a été purifié pour la première fois en 1994 à partir de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* et a été décrit comme un complexe stable de 220 kDa (Machesky et al., 1994). Il est composé de sept protéines dont deux apparentées à l'actine Arp2 et Arp3 (« actin related protein » d'où « Arp »). Les autres sous-unités sont appelées ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 et ArpC5 (Figure 11a). Le complexe Arp2/3 est conservé chez de nombreuses espèces: il a été purifié à partir de levures (Winter et al., 1997) mais aussi de vertébrés (Welch et al., 1997a). Tous les eucaryotes dont le génome a été séquencé possèdent l'ensemble des gènes capables de coder pour chacune des sept sous-unités du complexe.

## 1.3. Fonction moléculaire du complexe Arp2/3

Quelques années plus tard, une étude a montré que le complexe Arp2/3 activait la polymérisation d'actine à la surface de *Listeria* (Welch et al., 1997b). Ces résultats ont montré que l'assemblage d'actine nucléé par le complexe Arp2/3 était capable de générer une force et du mouvement. Contrairement aux autres nucléateurs de l'actine, le complexe Arp2/3 a la particularité de former un réseau d'actine branché (Svitkina and Borisy, 1999). En effet, le complexe Arp2/3 se lie à un filament d'actine préexistant et initie la formation d'un filament fille polymérisée à un angle de 70° par rapport au filament mère (Blanchoin et al., 2000; Mullins et al., 1998). Il est localisé *in vivo* et *in vitro* au niveau des jonctions en Y des branches (Egile et al., 2005) (Figure 11b). Par conséquent, le bout pointu du filament naissant est engagé par le complexe Arp2/3 et ne laisse donc que l'extrémité barbée libre qui peut être polymérisée.



**Figure 11. Le complexe Arp2/3 est localisé à la jonction des branches.** a, Structure du complexe Arp2/3 constitué de ses sept sous-unités par cristallographie (Egile et al., 2005). b, Branches d'actines observées par microscopie électronique sur lesquelles est représenté en couleur la position des complexes Arp2/3. Extrait de (Rouiller et al., 2008).

#### 1.4. Activation du complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 purifié est inactif (Blanchoin et al., 2000; Machesky et al., 1999; Robinson et al., 2001). Pour être activé, il nécessite la présence d'un filament d'actine préexistant (Higgs et al., 1999) et un activateur de la famille des NPFs (« Nucleation Promoting Factor ») (Machesky et al., 1999; Welch et al., 1998)



### 1.4.1. Activation par les NPFs

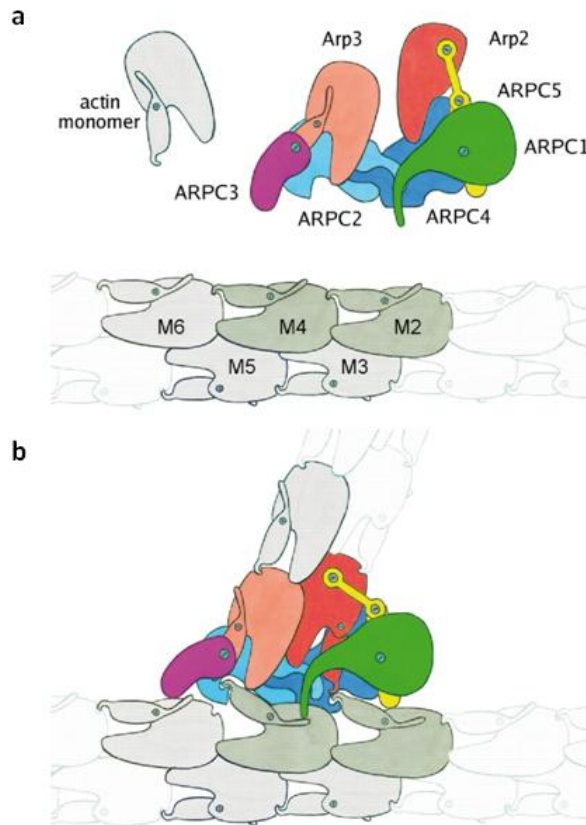
La famille des NPFs est caractérisée par un domaine d'homologie à l'extrémité C-terminale, appelé VCA (aussi appelé WCA) divisé en trois motifs dont chacun joue un rôle majeur dans l'activation du complexe Arp2/3. Il contient le motif V (pour « Verprolin homology » ou aussi appelé WH2 pour « WASp homology 2 »), le motif central connecteur C et le motif A en C-terminal constitué d'une séquence « Acide ».

Les motifs C et A contribuent tout deux à l'association avec le complexe Arp2/3 (Marchand et al., 2001) et permettent un changement conformationnel de ce dernier (Goley et al., 2004; Rodal et al., 2005). Le motif V permet d'interagir avec un monomère d'actine-G (Chereau et al., 2005; Marchand et al., 2001). Le domaine VCA seul est suffisant pour l'activation du complexe Arp2/3 et l'initiation de la polymérisation d'actine branchée (Machesky et al., 1999).

### 1.4.2. Mécanisme général d'activation du complexe Arp2/3

L'étude comparative de la structure du complexe actif et inactif montre des changements de conformations importants entre les deux formes (Pollard, 2007; Rouiller et al., 2008) (Figure 12a et 12b). Ce changement conformationnel implique que les sept sous-unités du complexe coopèrent durant la transition. Ainsi, le complexe Arp2/3 peut être décrit comme « machine moléculaire », notion introduite par Bruce Alberts qui définit un complexe protéique stable dont l'ensemble des sous-unités se coordonne pour remplir la fonction du complexe (Alberts, 1998).

Dans la forme inactive, les deux sous-unités Arp2 et Arp3 sont éloignées l'une de l'autre (Figure 12a) (Pollard, 2007; Rouiller et al., 2008). Suite à l'activation du complexe par un NPF, les deux sous-unités se rapprochent et miment l'extrémité barbée d'un filament d'actine qui peut être allongée (Figure 12b) (Robinson et al., 2001; Rouiller et al., 2008; Volkman et al., 2001). Le domaine WH2 d'un NPF apporte le premier monomère d'actine G. Il forme, avec Arp2 et Arp3 le noyau trimérique d'actine qui permet l'initiation de l'élongation du filament fille. En interagissant avec le filament d'actine mère et le NPF, le complexe Arp2/3 est ainsi maintenu sous sa forme active et stable (Goley et al., 2004; Rodal et al., 2005). Ce modèle général d'activation est bien admis, cependant le détail concernant le mécanisme de l'activation du complexe Arp2/3 est sujet à de nombreuses controverses.



**Figure 12. Représentation schématique de l'assemblage du complexe Arp2/3 au niveau des branches.** a, Structure du complexe Arp2/3 sous sa forme inactive à proximité d'un filament mère. b, Structure du complexe Arp2/3 au niveau des jonctions. Les sous-unités Arp2 et Arp3 miment une extrémité barbée et génèrent la formation d'un filament fille (Rouiller et al., 2008).

### 1.4.3. Avancées sur la compréhension précise du mécanisme d'activation

Pendant quelques années, le mécanisme d'activation du complexe Arp2/3 fut sujet à débats suite à la divergence des résultats publiés. Les premières études suggéraient que le premier monomère d'actine délivré par le NPF était associé à la sous unité Arp3 (Beltzner and Pollard, 2004; Kreishman-Deitrick et al., 2005; Marchand et al., 2001). D'autres études apparues quelques années plus tard ont, elles montrés qu'il était associé à la sous unité Arp2 (Boczkowska et al., 2008). L'hypothèse quant à la présence d'un seul site d'interaction des NPFs sur le complexe Arp2/3 s'est très vite révélée erronée et appuyée par de nombreuses observations. En effet, la dimérisation des domaines VCA permet d'augmenter l'activation d'Arp2/3 (Padrick et al., 2008). De plus, les NPFs sont fréquemment regroupés sur les membranes ou liés à des partenaires dimériques dans la cellule (Padrick et al., 2008). Le doute a été levé par deux études confirmant la présence de deux sites de liaisons des domaines VCA sur le complexe Arp2/3 (Padrick et al., 2011; Ti et al., 2011). Récemment un nouveau modèle séquentiel d'activation a été proposé : les deux actines-VCA interagiraient avec Arp2 et Arp3 dans une configuration pseudo-symétrique. Le premier monomère d'actine serait associé à Arp2 et ArpC1

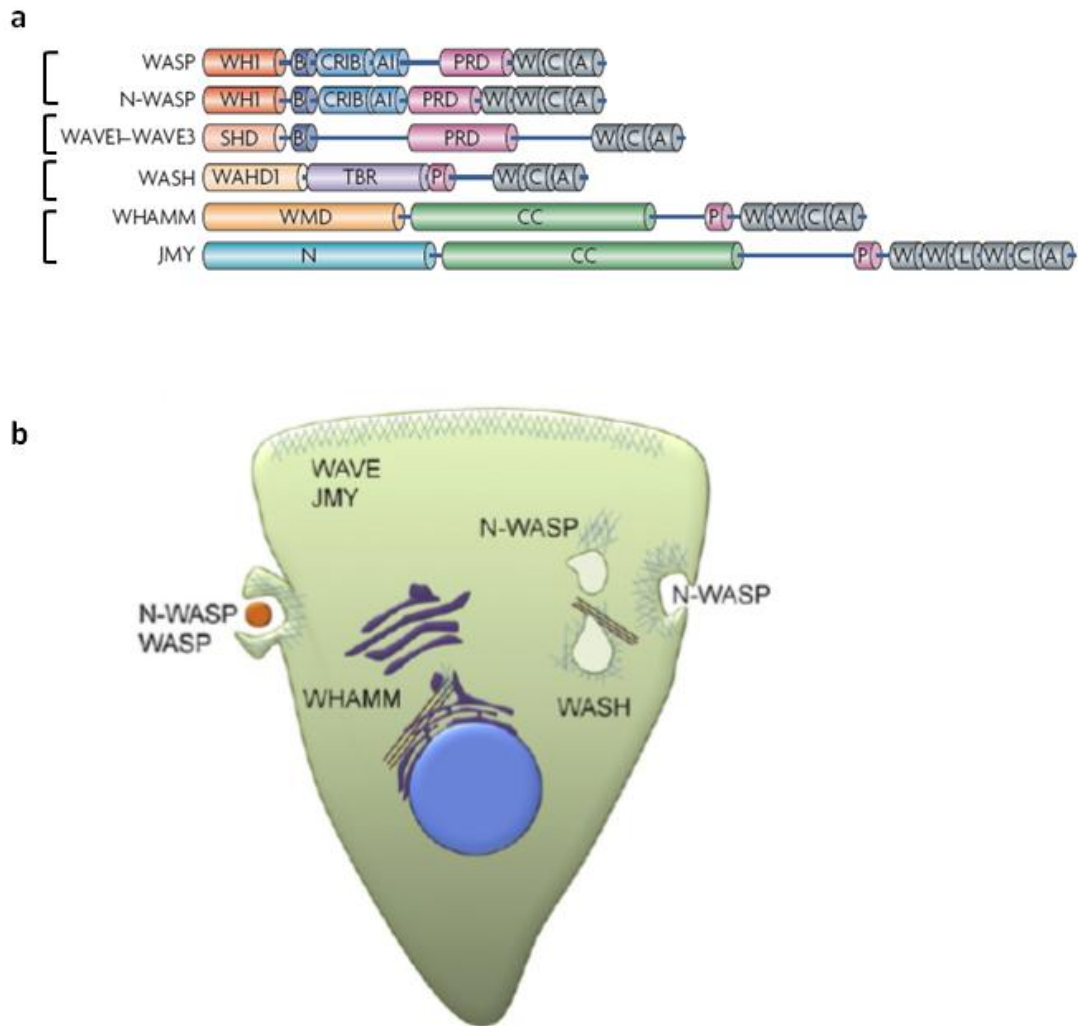
entraînant un changement de conformation qui libérerait le bout barbé d'Arp3 pouvant alors accueillir le deuxième monomère d'actine. Cette deuxième interaction entraînerait également un changement de conformation qui finaliserait la transition entre forme inactive et forme active d'Arp2/3 (Boczkowska et al., 2014).

## 2. Les activateurs du complexe Arp2/3: les NPFs

La régulation spatiale et temporelle du complexe Arp2/3 est sous la dépendance des NPFs. En effet, le complexe Arp2/3 est distribué de façon homogène dans tout le cytoplasme. Au contraire, les NPFs liés à différentes membranes cellulaires, sont capables de recruter et d'activer localement le complexe Arp2/3 (Figure 13a). Les NPFs forment des complexes multi-protéiques stables qui répondent à différentes voies de signalisations.

Les membres de la famille des NPFs possèdent tous en commun un domaine VCA en C-terminal, permettant l'activation du complexe Arp2/3. Le domaine N-terminal, en revanche, définit les différentes familles de NPFs et sert à la structuration des complexes multi-protéiques qui les contiennent. Les NPFs sont composés de quatre familles de protéines (Figure 13b). Les premières caractérisées furent WASP (« Wiskott-Aldrich Syndrom Protein ») et neural WASP (N-WASP). WAVE (« WASP family Verprolin Homologous Protein » aussi connu sous le nom de SCAR) et ses trois isoformes ont été découverts quelques années plus tard. Plus récemment les protéines WASH (« WASP and SCAR homologue ») (Linardopoulou et al., 2007), WHAMM (« WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules ») (Campellone et al., 2008) et JMY (« junction-mediating regulatory protein ») (Zuchero et al., 2009) ont été identifiées.

Dans la cellule, les NPFs sont régulés par des modulations allostériques intramoléculaires autorisant ou non l'accessibilité de leur domaine VCA en C-terminal, c'est le cas pour WASP et N-WASP, ou par des modulations intermoléculaires pour WAVE.



**Figure 13. Structures et localisations dans la cellule des différents NPFs.** a, La structure des quatre familles de NPFs (WASP/N-WASP, WAVE, WASH, WHAMM/JMY) montre qu'ils contiennent tous en C-terminal un domaine WCA qui permet d'interagir avec le complexe Arp2/3 et un monomère d'actine, ainsi que diverses régions de régulations en N-terminale. Extrait de (Campellone and Welch, 2010). b, Chacun des NPFs est localisé spécifiquement dans la cellule pour réguler la formation d'actine branchées par le complexe Arp2/3. WAVE joue un rôle dans la migration cellulaire. Un rôle indirect de JMY dans la migration cellulaire a aussi été rapporté. N-WASP et WASP sont impliqués dans la phagocytose et l'endocytose. WASH favorise la fission des endosomes. WHAMM est essentiel pour le transport de vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Extrait de (Burianek and Soderling, 2013).

## **2.1. WASP et N-WASP**

### **2.1.1. Découverte et fonctions physiologiques des WASP**

En 1994, WASP a été identifié comme un gène muté, associé au syndrome Wiskott-Aldrich (Derry et al., 1994). Cette maladie est caractérisée par une immunodéficience, une thrombocytopénie et de l'eczéma causés par un défaut de fonction des lymphocytes et des plaquettes. Dans l'organisme, WASP est spécifiquement exprimé dans les cellules hématopoïétiques. Dans les cellules, des mutations de ce dernier résultent en des défauts de migrations, des défauts de phagocytoses et des défauts de signalisations des lymphocytes T.

N- WASP, pour neural WASP et homologue de WASP, fut découvert peu de temps après, suite à la recherche de protéines interagissant avec le domaine SH3 (« Src homology domain ») du facteur de croissance Grb2 (« growth factor receptor binding protein 2 ») (Miki et al., 1996). Malgré son appellation, N-WASP est exprimé de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus mais est il est enrichi dans le cerveau. Par conséquent, des délétions de N-WASP entraînent une létalité embryonnaire chez la souris. En raison de l'homologie de WASP et N-WASP, nous parlerons par la suite seulement de N-WASP.

### **2.1.2. Fonction cellulaire de N-WASP**

La voie de signalisation impliquant N-WASP joue un rôle dans l'endocytose (Benesch et al., 2005; Merrifield et al., 2004). En effet, la polymérisation d'actine médiée par N-WASP via le complexe Arp2/3 est requise durant l'étape d'internalisation pour aboutir à la fission d'endosomes à partir de la membrane plasmique. En plus de ce rôle de fission, N-WASP contribue à la propulsion des endosomes loin de la membrane grâce à la formation de comètes d'actine (Benesch et al., 2002). N-WASP joue aussi un rôle dans la formation de podosomes et d'invadopodes, structures protrusives formées par les macrophages et les cellules cancéreuses respectivement (Mizutani et al., 2002; Yamaguchi et al., 2005).

### 2.1.3. Les domaines de N-WASP

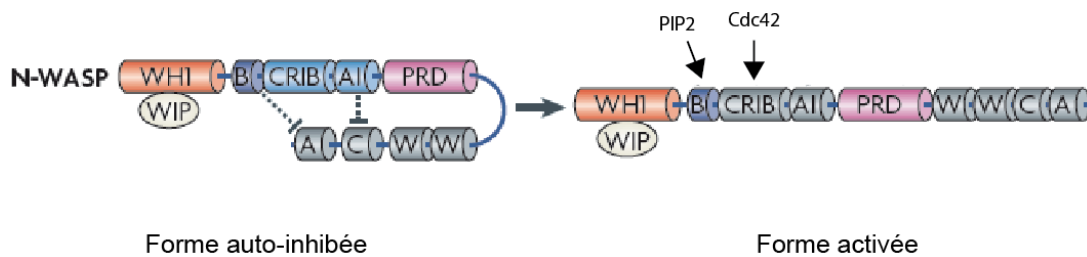
N-WASP possède en N-terminal un domaine WH1 suivi d'une région basique, d'un domaine CRIB (« Cdc42/Rac-interactive binding region » ou aussi appelé GBD pour « GTPase binding domain », d'un domaine riche en proline (PRD) puis du domaine VCA en C-terminal. Ces domaines permettent à N-WASP d'interagir avec PIP2 via le domaine basique et avec la petite GTPase Cdc42 via le domaine CRIB (Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi et al., 2000; Rohatgi et al., 1999).

Dans sa forme native, N-WASP est associé de façon stable à WIP (« WASP interacting protein ») (Aspenstrom, 2002; Aspenstrom, 2004; Ho et al., 2001; Kato et al., 2002). Cette interaction a été caractérisée par des expériences de fractionnements à partir d'extraits de cerveaux dans lesquelles un seul pic d'élution a été identifié et correspond à N-WASP/WIP. Ces résultats suggèrent que ce complexe constitue la majorité du pool cellulaire de N-WASP (Ho et al., 2001). Diverses études ont montré que le domaine WH1 de N-WASP permettait d'interagir de manière stable avec WIP et maintiendrait la stabilité de N-WASP (Krzewski et al., 2006; Sawa and Takenawa, 2006). D'ailleurs, le domaine WH1 est très fréquemment muté chez les patients atteints de WAS soulignant l'importance physiologique de l'interaction avec WIP (Imai et al., 2003; Stewart et al., 1999).

### 2.1.4. Auto-inhibition et activation de N-WASP

Dans la cellule, la protéine N-WASP est repliée sur elle-même par des interactions intramoléculaires entre la queue VCA en C-terminale et une région en N-terminale incluant le domaine CRIB et le domaine basique (Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 1999). Dans cette conformation, la protéine est inactive puisque le domaine VCA est masqué (Figure 14). Mise à part ces interactions intramoléculaires, l'interaction avec WIP favorise également l'inhibition de N-WASP (Ho et al., 2004; Martinez-Quiles et al., 2001).

Pour activer N-WASP, le domaine CRIB joue un rôle critique. Il interagit avec la petite GTPase Cdc42 sous sa forme liée au GTP de manière mutuellement exclusive (Buck et al., 2001; Kim et al., 2000; Rohatgi et al., 2000; Rohatgi et al., 1999). Par conséquent, le domaine VCA est libéré et peut activer le complexe Arp2/3. Le domaine basique contribue lui aussi à l'auto-inhibition de N-WASP. Ainsi, l'interaction de PIP2 sur la région basique agit en synergie avec Cdc42 pour l'activation de N-WASP (Kim et al., 2000; Miki et al., 1998a; Prehoda et al., 2000) (Figure 14). D'autres protéines sont aussi impliquées dans cette activation comme Toca-1 (« Transducer of Cdc42 activity ») un effecteur de Cdc42, des protéines à domaines SH3 (Carlier et al., 2000; Kowalski et al., 2005; Rohatgi et al., 2001; Takenawa and Suetsugu, 2007), mais N-WASP est aussi activé par phosphorylations (Cory et al., 2003; Suetsugu et al., 2002; Torres and Rosen, 2003; Torres and Rosen, 2006).



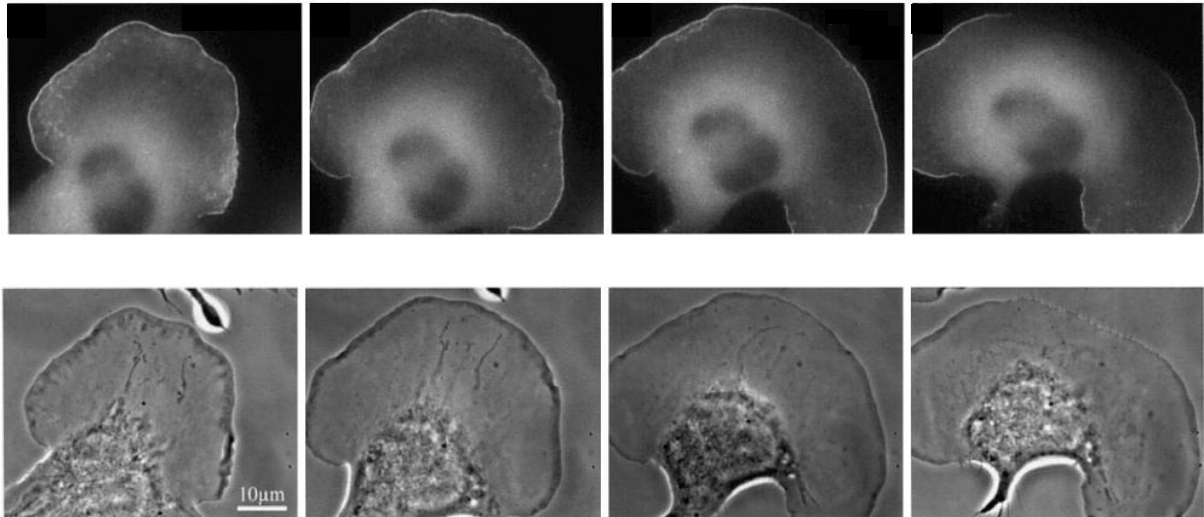
**Figure 14. N-WASP est auto-inhibé par des interactions intra-moléculaires.** L'activité de N-WASP est régulée via différentes interactions intramoléculaires. Le domaine WCA est inhibé par son interaction avec le domaine d'auto-inhibition (AI) et le domaine basique (B). L'activation de N-WASP se fait via l'interaction du domaine basique avec PIP2 membranaire et du domaine CRIB (Cdc42 and Rac interactive binding) avec la petite GTPase Cdc42. Le domaine WCA est alors libéré et peut interagir avec le complexe Arp2/3. Extrait de (Campellone and Welch, 2010)

## 2.2. Le complexe WAVE

La protéine WAVE1 pour, WASP-family Verprolin-homologous protein 1 a été découverte grâce à son homologie de séquences avec la protéine WASP (Miki et al., 1998b). La même année, un homologue de WAVE a été découvert chez l'amibe *Dictyostelium*, décrit comme Suppresseur du récepteur mutant de AMPc (cAR) et appelé SCAR1 (Bear et al., 1998; Machesky and Insall, 1998). Très vite, deux nouveaux homologues de WAVE1 ont été identifiés : WAVE2 et WAVE3 (Suetsugu et al., 1999). Chez les mammifères, WAVE2 est exprimé de manière ubiquitaire, alors que WAVE1 et 3 sont exprimés de manière tissu-spécifique (Sossey-Alaoui et al., 2003) avec un enrichissement dans le cerveau.

### 2.2.1. Fonction cellulaire du complexe WAVE

L'activation du complexe WAVE à la membrane permet d'induire la formation d'actines branchées via le complexe Arp2/3. De ce fait, le complexe WAVE est impliqué dans la formation des lamellipodes et joue un rôle essentiel dans la motilité cellulaire. Des études dans lesquelles les gènes de WAVE 1 et 2 ont été délétés dans des fibroblastes ont révélé des rôles distincts de ces protéines. WAVE2 est localisé au front de la cellule en migration et régule la formation des lamellipodes (Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003). Il est intéressant de noter que là où le lamellipode se rétracte, WAVE est délocalisé (Figure 15). WAVE1, quant à lui semble promouvoir la formation de « dorsal ruffles » et stabiliserait les lamellipodes (Yamazaki et al., 2005). Le rôle de WAVE 3 est moins connu, même si des études ont montré que, comme WAVE2, il jouerait un rôle dans la formation de lamellipodes (Sossey-Alaoui et al., 2007a; Sossey-Alaoui et al., 2007b).



**Figure 15. Localisation de WAVE au lamellipode.** Séquences d'images de cellules de mélanomes B16F1 exprimant GFP-WAVE en microscopie à fluorescence (haut) et en contraste de phase (bas). WAVE est localisé au lamellipode et disparaît lorsque la cellule se rétracte. Adapté (Hahne et al., 2001)

Des études récentes ont montré que la sous-unité Sra1 joue un rôle majeur dans la biogénèse des transporteurs impliqués dans la voie de transport entre l'appareil de Golgi et les endosomes (« TGN-to-endosomes pathway ») (Anitei and Hoflack, 2012; Anitei et al., 2010). Sra1 est co-localisé sur la membrane des endosomes avec la clathrine et l'adaptateur AP1 et permet le recrutement local de Rac qui active N-WASP et possiblement WAVE entraînant la formation d'un réseau d'actine branché par le complexe Arp2/3 nécessaire à la tubulation des transporteurs. Le rôle du complexe WAVE reste cependant à clarifier, car, bien qu'interagissant avec les membranes liées à la clathrine et à AP-1, la déplétion de WAVE n'a pas d'effet sur ces structures (Anitei et al., 2010).

Dans un contexte multicellulaire, WAVE2 induit la formation de lamellipodes pour faciliter les contacts cellules-cellules des cellules épithéliales. Ces cellules forment alors des jonctions adhérentes de type cadhérines qui sont stabilisées par WAVE2 (Yamazaki et al., 2007). D'autres études ont également montré que les protéines WAVE favorisaient la séparation des cellules filles lors de la cytokinèse (King et al., 2010), et favorisaient la répartition symétrique de l'appareil de Golgi (Kondylis et al., 2007). Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre plus précisément les détails de ces fonctions « atypiques » du complexe WAVE.

### 2.2.2. Architecture du complexe WAVE

Les protéines de la famille WAVE possèdent plusieurs domaines. En N-terminal, ils contiennent le domaine SHD (« SCAR homology domain »), un domaine basique, le domaine PRD (« Proline Rich Domain ») et le domaine VCA en C-terminal. Contrairement à WASP et N-WASP, la



protéine WAVE fait parti d'un complexe appelé « WAVE Complex » (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Innocenti et al., 2004). C'est un complexe pentamérique stable de 400kDa composé de WAVE1 (ou ses paralogues WAVE2 et WAVE 3), BRK1 (ou HSPC300), Abi1 (« ABL interactor 1 », ou ses paralogues Abi1 et Abi3), NAP1 (« NCK-associated protein 1 », ou son paralogue Hem1) et SRA1/Cyfp1 (« specifically RAC1-associated protein1 », ou son paralogue Cyfp2). En conséquence, différents isoformes du complexe WAVE peuvent être assemblés par la combinaison des différents paralogues de chaque composant (Derivery and Gautreau, 2010b). Ces différentes combinaisons forment probablement un complexe d'architecture similaire mais comportant des subtilités dans leur mode de régulation. Toutefois, le complexe ubiquitaire de WAVE est composé de : SRA1, Nap1, Abi1, Brk1 et WAVE2.

De manière similaire à N-WASP, le complexe WAVE est stable, au vu de la présence d'un seul pic détecté pour WAVE lors du fractionnement d'extraits cellulaires en gradient de sucrose et constitue la majorité du pool cellulaire de WAVE (Gautreau et al., 2004). Les sous-unités du complexe, Sra1, Nap1 et Abi1 sont également détectées dans ce pic unique. Seul Brk1, a un profil d'élution contenant deux pics, dont un correspond à Brk1 au sein du complexe WAVE alors que le deuxième correspond à la sous-unité Brk1 sous forme trimérique qui joue un rôle de précurseur à l'assemblage du complexe WAVE (Derivery et al., 2008). Ainsi, ces expériences de fractionnements suggèrent que chacune des sous-unités est constamment associée de façon stable dans la cellule. (Gautreau et al., 2004). La déplétion de l'un de ces composants déstabilise la totalité du complexe dont chacune des sous-unités est dégradée par le protéasome (Blagg et al., 2003; Ibarra et al., 2006; Kunda et al., 2003; Steffen et al., 2004).

### 2.2.3. Activation du complexe WAVE

Le complexe WAVE est activé à la membrane plasmique de la cellule grâce à plusieurs mécanismes.

#### 2.2.3.1. Le complexe WAVE est un effecteur de Rac

La formation des lamellipodes est sous le contrôle de la petite GTPase Rac. Depuis près d'une quinzaine d'années, les protéines WAVE sont décrites comme effectrices de Rac (Miki et al., 1998b). Cependant le lien entre les deux protéines fut longtemps inconnu. En effet, contrairement à N-WASP, WAVE ne possède pas de domaine GBD qui lui permette de se lier aux GTPases. La découverte de l'existence d'un complexe stable dans lequel WAVE est associé a contribué à reconstituer les morceaux: la sous-unité Sra1 est connue depuis des années comme effectrice de Rac (Kobayashi et al., 1998).

#### 2.2.3.2. Activation du complexe WAVE par interactions moléculaires

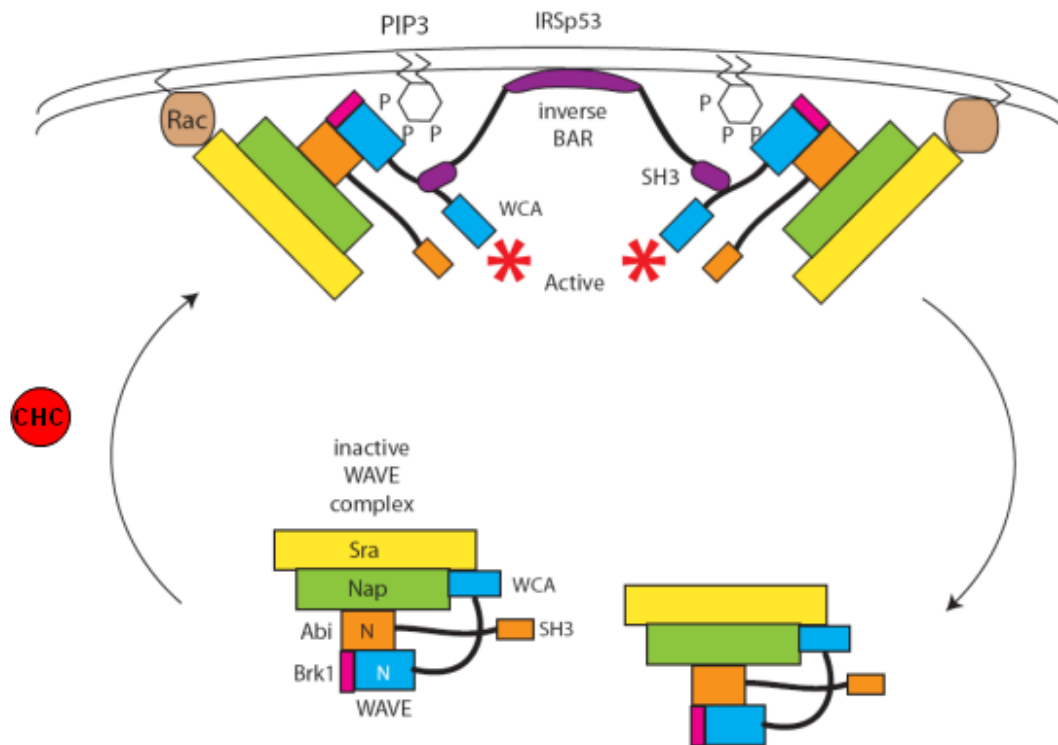
Pour être activé le complexe WAVE doit être recruté à la membrane plasmique. Comme nous venons de le voir, Rac sous sa forme liée au GTP recrute le complexe WAVE en interagissant avec Sra1 (Chen et al., 2010). La sous unité WAVE2 interagit d'une part, avec le produit de la kinase PI3K, le phospholipide PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Oikawa et al., 2004) et d'autre part avec le domaine SH3 de la protéine IRSp53 (« insulin receptor substrat protein de 53kDa ») via son domaine PRD (Abou-Kheir et al., 2008; Miki et al., 2000; Scita et al., 2008; Suetsugu et al., 2006). Récemment, des travaux dans notre laboratoire ont également révélé un rôle important de la clathrine (notamment la chaîne lourde) dans le recrutement du complexe WAVE à la membrane plasmique, probablement via son interaction avec la sous-unité Sra1 (Anitei et al., 2010). En effet, le complexe WAVE n'est plus localisé à la membrane plasmique lorsque CHC (« Clathrin Heavy Chain ») est déplété ce qui entraîne des défauts de protrusions et une réduction de la vitesse de migration (Gautier et al., 2011).

Le recrutement du complexe WAVE à la membrane plasmique et l'interaction avec les différents partenaires, Rac, PIP3 et IRSp53, démasquent la queue VCA de WAVE2 sur laquelle pourra se fixer le complexe Arp2/3 (Figure 16). Par ailleurs, la protéine IRSp53 contient un domaine BAR modifié qui se dimérise pour incurver les membranes et favoriser la protrusion de la membrane plasmique par la polymérisation d'actine branchée.

#### 2.2.3.1. Activation par phosphorylations

L'activation du complexe WAVE est aussi dépendante de phosphorylations. En effet, la kinase Abelson (Abl) est essentielle à l'activation de WAVE2 et WAVE3 *in vivo* (Leng et al., 2005; Sossey-Alaoui et al., 2007a; Stuart et al., 2006). La tyrosine 150 de WAVE2 (ou Tyr 151 de WAVE1 et WAVE3) apparaît comme être le site majeur de phosphorylation (Chen et al., 2010; Leng et al., 2005; Stuart et al., 2006). La kinase Abl est recrutée au complexe WAVE via la sous-unité Abi d'où son nom « Abl interactor » (Dai and Pendergast, 1995; Shi et al., 1995). La kinase Src phosphoryle quant-à elle, la Tyr125 sur WAVE1, résidu conservé chez WAVE2 et 3 (Arder et al., 2006; Chen et al., 2010). La conséquence de la phosphorylation sur une des trois tyrosines conservées de WAVE1 (Tyr151, Tyr125, Tyr138) est l'augmentation de l'activité NPF du complexe WAVE. En effet, ces modifications post-traductionnelles perturbent les sites d'auto-inhibitions et libèrent la queue VCA de la sous-unité Sra1 (Arder et al., 2006; Chen et al., 2010; Miyamoto et al., 2008). D'autres kinases régulent aussi l'activité du complexe WAVE. La Cdk5 (« cycline dépendant kinase 5 ») phosphoryle des résidus sérines dans le domaine riche en proline de WAVE1 (Kim et al., 2006c) alors que la Caséine Kinase 2 phosphoryle le domaine VCA de la protéine WAVE2 (Pocha and Cory, 2009). Cependant dans les deux cas, ces phosphorylations aboutissent à une inhibition de l'activité NPF. Les phosphorylations constituent ainsi un mécanisme supplémentaire de régulation rapide et réversible qui

permet aux cellules motiles de fournir une réponse rapide aux modifications de leur environnement. Déterminer la combinaison de phosphorylations nécessaires à une activité maximale du complexe WAVE reste une des prochaines énigmes à élucider.



**Figure 16. Le cycle d'activation du complexe WAVE.** Le complexe WAVE est inactif dans le cytosol et est auto-inhibé par interactions intermoléculaires entre les sous-unités du complexe qui masquent la queue VCA. Le complexe WAVE est recruté à la membrane par différents mécanismes: la clathrine (CHC, « clathrin heavy chain ») interagit avec le complexe WAVE et l'apporte à la membrane plasmique ; la sous unité Sra1 interagit avec Rac ; la sous-unité WAVE interagit avec PIP3 ; le domaine riche en proline de WAVE interagit avec la protéine IRSp53. Toutes ces interactions contribuent à l'activation du complexe WAVE: le domaine VCA de WAVE est libre pour activer le complexe Arp2/3. La dimérisation de IRSp53 contenant un domaine BAR inversé, permet de courber la membrane plasmique et induit, avec la polymérisation d'actine branchée, la protrusion du lamellipode. Adapté de (Derivery and Gautreau, 2010b; Gautier et al., 2011)

## 2.3.WASH

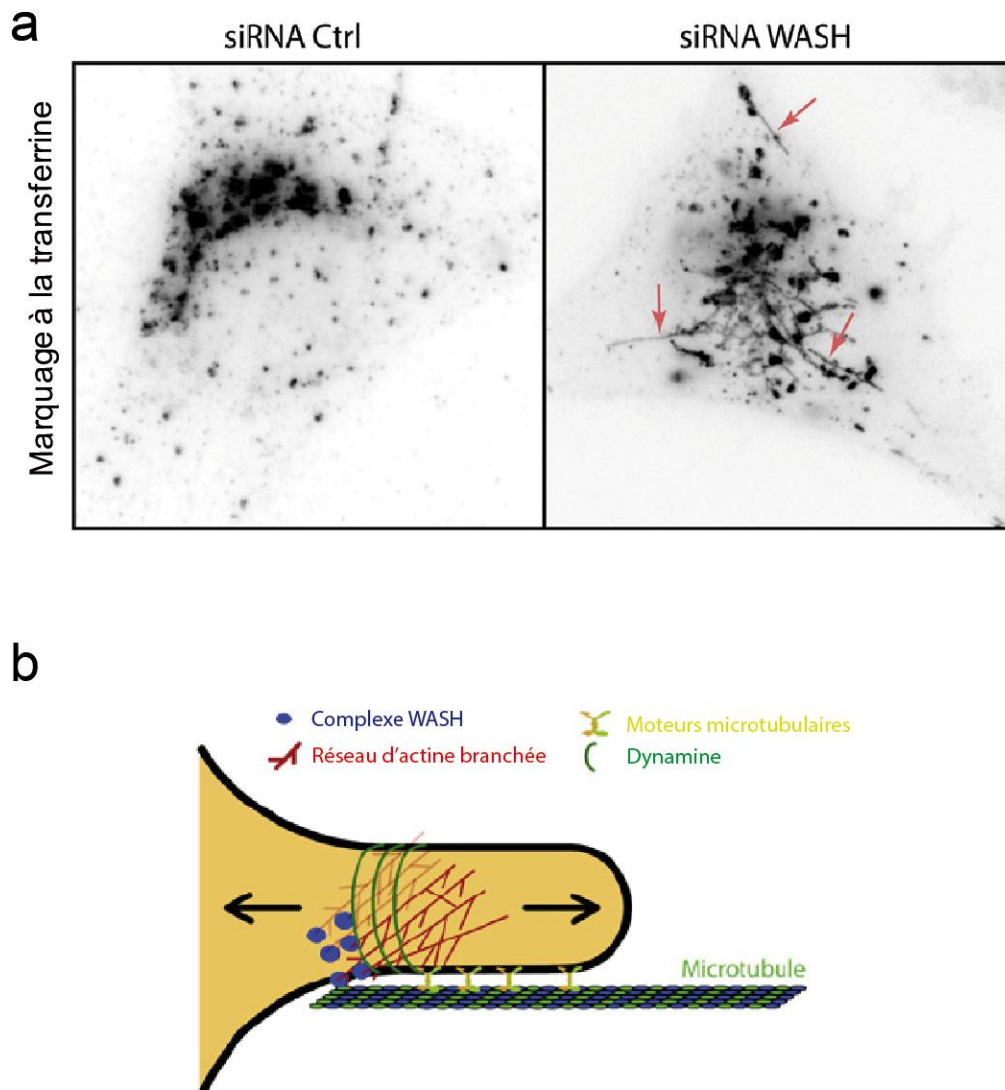
Le gène codant la protéine WASH (« WASP ans Scar Homolog ») fut découvert en 2007 (Linardopoulou et al., 2007). Des gènes similaires ont été retrouvés chez tous les eucaryotes excepté chez les levures et chez *Arabidopsis* (Derivery and Gautreau, 2010a)

### 2.3.1. Fonctions cellulaires de WASH

En colocalisant WASH avec différents marqueurs d'endosomes, les études ont montré que WASH était localisé sur tous les organelles des systèmes endosomales et lysosomales et majoritairement sur les endosomes précoces et les endosomes de recyclages (Derivery et al., 2009b; Duleh and Welch, 2010; Gomez and Billadeau, 2009). A la surface des endosomes WASH est localisé sur des domaines restreints grâce au complexe rétromère qui est impliqué dans le transport des endosomes vers l'appareil de Golgi (Derivery et al., 2012; Helfer et al., 2013). La déplétion de WASH par ARN interférents entraîne la disparition du réseau d'actine aux endosomes, suggérant que WASH recrute et active le complexe Arp2/3 dans cette région (Derivery et al., 2009b; Gautreau et al., 2014).

Des études ont révélé le rôle de WASH dans la scission des endosomes. Les endosomes sont des plateformes de tri de cargos pour les diriger vers différentes routes. Ces intermédiaires de transports sont formés par des protrusions tubulaires qui sont ensuite détachés par scission membranaire. Sous la déplétion de WASH par ARN interférents, les endosomes s'allongent et forment des tubules de manière exagérée, signe d'un défaut de fission (Derivery et al., 2009b; Gomez and Billadeau, 2009) (Figure 17a). Ces élongations sont dues à l'interaction de l'endosome avec des moteurs moléculaires qui se déplacent le long du microtubule et qui tirent le tube (Figure 17b). Effectivement, les tubules ne sont plus observés après traitement des cellules au nocodazole qui dépolymérise les microtubules. Le phénotype de tubulation est associé avec des défauts de transports de cargo impliqués dans des voies majeures: la voie de recyclage des récepteurs à la transferrine (Derivery et al., 2009b),  $\beta 2$  adrénergique (Puthenveedu et al., 2010), intégrines (Duleh and Welch, 2012; Zech et al., 2011), Glut1, TCR (Piotrowski et al., 2013) ; le transport rétrograde du récepteur au mannose-6-phosphate (Gomez and Billadeau, 2009; Harbour et al., 2010) et la voie de dégradation du récepteur EGF (Duleh and Welch, 2012).

En plus de son rôle dans la scission, plusieurs études ont suggéré que WASH jouerait un rôle dans la phase d'élongation du tubule. Des cellules provenant de souris KO totalement déficientes en WASH, ont alors comme phénotype des endosomes élargis sans tubules (Gomez et al., 2012). Ce même phénotype est observé lorsque l'on traite les cellules avec des drogues inhibant le complexe Arp2/3 (Derivery et al., 2012). Par ailleurs, les travaux de Gomez et al., 2012, ont aussi noté la présence d'agrégats d'endosomes et de lysosomes en absence de WASH suggérant que WASH



**Figure 17. WASH est impliqué dans la scission des endosomes.** a, Une internalisation de la transferrine fluorescente a été réalisée sur des cellules fibroblastiques de souris transfectées avec un siRNA ctrl ou un siRNA ciblant WASH. Les cellules ont été observées par microscopie à épifluorescence. Lorsque WASH est déplété, les endosomes forment des tubules (flèches rouges). b, Représentation d'un bourgeon émanant d'un endosome. Une tension de membrane est créée par deux forces opposées: d'une part par les moteurs microtubulaires qui tirent le bourgeon pour former le tube (flèche droite), d'autre part la formation d'un réseau d'actine branché autour du cou du bourgeon, initié par le complexe WASH, et qui, à l'aide de la Dynamine, favorise la scission du tube (flèche gauche). (Derivery et al., 2009b)

générerait un réseau d'actine branchée autour de la vésicule qui l'empêcherait de s'agréger aux autres (Drengk et al., 2003) .

### 2.3.2. Architecture du complexe WASH

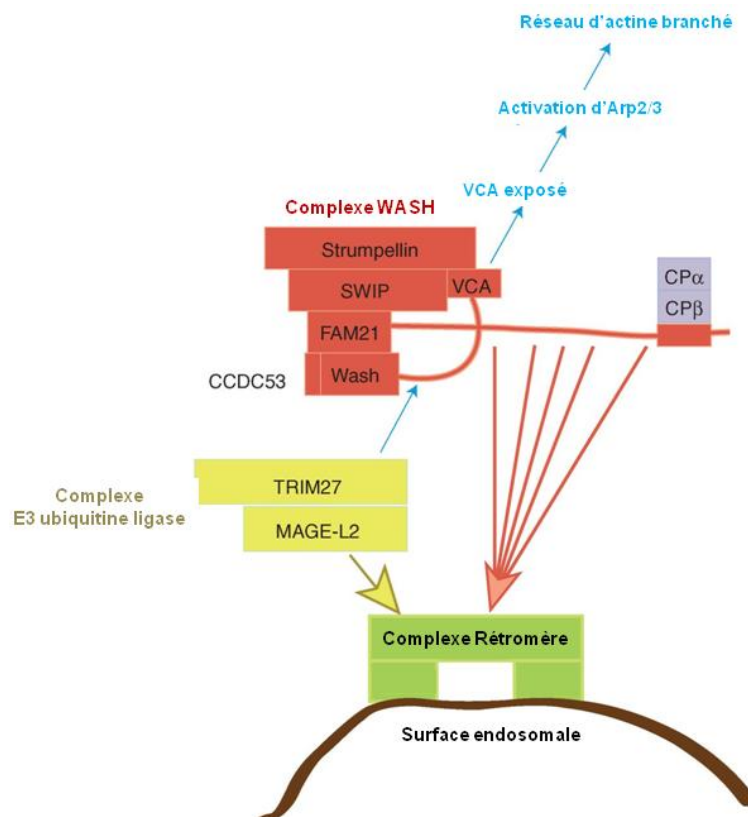
La protéine WASH contient en N-terminal un domaine WAHD1 (« WASH homology domain 1 »), suivi d'un domaine riche en proline (PRD) puis d'un domaine VCA en C-terminal. Comme la protéine WAVE, WASH fait parti d'un complexe avec au moins six autres protéines (Derivery et al., 2009b; Gomez and Billadeau, 2009) appelé le « WASH complex ». Dans ce complexe, la protéine WASH interagit de façon stable avec les protéines FAM21, Strumpellin, SWIP, Ccdc53 (Derivery et al., 2009b; Jia et al., 2010). Dans une seconde étape, l'hétérodimère de coiffe composé de CapZ $\alpha$  et  $\beta$  est également recruté au complexe. Cette interaction se fait via le domaine C-terminal de la sous unité FAM21 (Derivery et al., 2009b; Jia et al., 2010)

Comme le complexe WAVE, le complexe WASH est un complexe stable où les différentes sous-unités sont requises pour la stabilité du complexe. La dégradation d'une des sous-unités, y compris l'hétérodimère CapZ, est capable de déstabiliser le complexe entier (Derivery et al., 2009b). Des expériences de polymérisation *in vitro* montrent que la protéine WASH seule est capable d'activer le complexe Arp2/3 mais ce n'est plus le cas lorsqu'il est intégré dans le complexe WASH (Jia et al., 2010). Cela suggère que le complexe WASH, de la même façon que le complexe WAVE est intrinsèquement sous une forme inhibé où le domaine VCA serait masqué.

### 2.3.3. Régulation du complexe WASH

Le complexe WASH, tout comme le complexe WAVE est inactif en raison des interactions inter-moléculaires qui masquent la queue VCA. L'activation du complexe WASH est régulée par l'E3 RING ubiquitine ligase, TRIM27-MAGE-L2 qui poly-ubiquitine WASH au niveau de sa queue flexible qui expose alors son motif VCA (Hao et al., 2013). La déplétion de cette enzyme montre le même phénotype que la déplétion de WASH, c'est-à-dire, une tubulation des endosomes.

L'activation de WASH par l'ubiquitine ligase a lieu à la surface des endosomes. En effet, des travaux récents ont montré que WASH était recruté aux endosomes par le complexe retromère via la queue C-terminale de sous-unité FAM21 (Harbour et al., 2010; Helfer et al., 2013; Jia et al., 2012). De façon intéressante, TRIM27-MAGE-L2 est également recruté sur les endosomes via le complexe rétromère (Figure 18). Cependant, les voies de signalisations qui régulent l'activité du complexe WASH ne sont pas encore bien connues. Des études ont montré que chez la drosophile, WASH pouvait être un effecteur de la petite GTPase Rho (Liu et al., 2009). Néanmoins, ils ont démontré que la présence de Rho ne permettait pas d'augmenter l'activité NPF de WASH.



**Figure 18. Régulation du complexe WASH.** La protéine WASH est associée en un complexe stable avec FAM21, Strumpellin, SWIP, Ccdc53 et à l'hétérodimère CapZα et β. La sous-unité FAM21 lui permet d'interagir avec le complexe rétromère sur les endosomes. Le complexe E3 ubiquitine ligase, TRIM27-MAGE-L2, également recruté par le complexe rétromère, poly-ubiquitine le domaine flexible de la sous-unité WASH qui expose alors son motif VCA. Le complexe Arp2/3 peut alors être activé et initie la formation d'un réseau d'actine branché à la surface de l'endosome. Adapté de (Gautreau et al., 2014)

## 2.4. WHAMM/JMY

WHAMM et JMY sont deux protéines homologues récemment identifiées et qui ne semblent être retrouvées que chez les vertébrés (Veltman and Insall, 2010). Comme les autres NPFs, ils possèdent tout deux un domaine N-terminal spécifique de la famille, une région riche en proline et un domaine VCA en C-terminal leur permettant d'activer le complexe Arp2/3 (Campellone et al., 2008; Zuchero et al., 2009). Malgré leur similarité de séquences, des rôles différents ont été rapportés pour WHAMM et JMY.

### 2.4.1. WHAMM

WHAMM est localisé principalement au niveau du *cis*-Golgi et au niveau des membranes vésiculo-tubulaires où il interagit avec le complexe Arp2/3. WHAMM régule le transport de vésicules du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi où il interagit avec le cytosquelette d'actine et les microtubules pour contrôler la tubulation des membranes et leur dynamique (Campellone et al., 2008).

Comme les autres NPFs, WHAMM possède un domaine VCA en C-terminal qui est capable d'activer le complexe Arp2/3 *in vitro*. Il a la caractéristique de posséder en N-terminal un domaine WMD (« WHAMM membrane-interacting domains ») d'interaction avec les membranes et un domaine central « coiled-coiled » qui interagit avec les microtubules. Contrairement aux autres NPFs, WHAMM n'est pas auto-inhibé et ne semble pas faire partie d'un complexe multi-protéique. Des études montrent qu'une fois associé aux microtubules, le domaine VCA de WHAMM est masqué alors que son domaine N-terminal est exposé et lui permet d'interagir avec les vésicules afin de les remodeler (Shen et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'activité de WHAMM serait directement contrôlée par son interaction avec les microtubules.

### 2.4.2. JMY (« junction mediating and regulatory protein »)

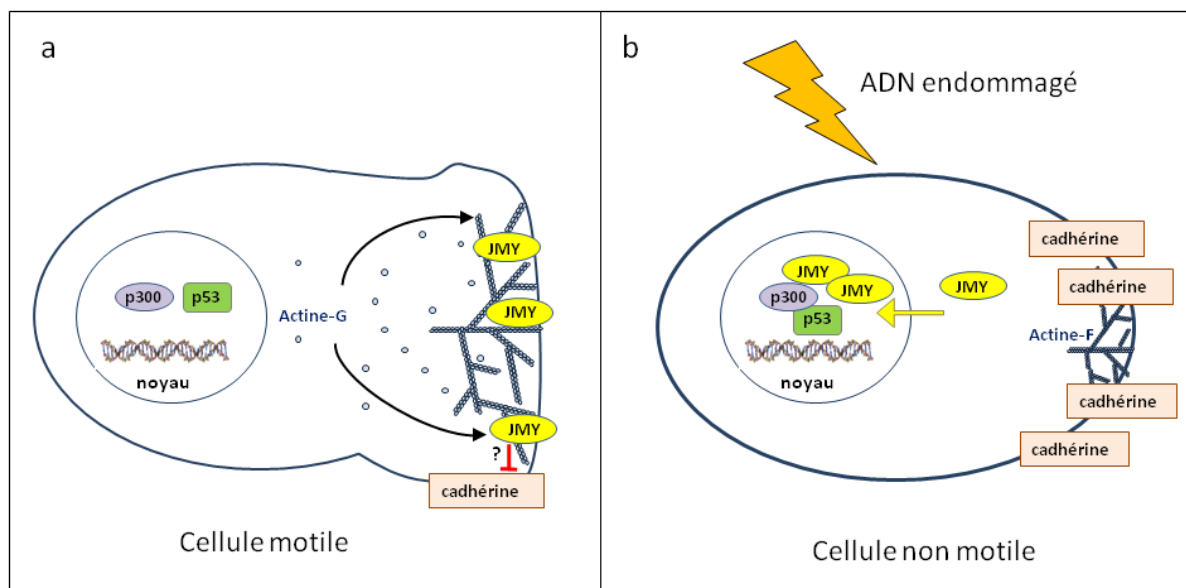
JMY est un NPF qui a la particularité de contenir trois domaines WH2 en C-terminal (VVVCA). De ce fait, contrairement à tous les autres NPFs, l'interaction avec trois monomères d'actine-G lui permet de nucléer seul un filament d'actine non branché, indépendamment d'Arp2/3 (Zuchero et al., 2009).

JMY a été identifié la première fois comme un co-facteur de transcription (Shikama et al., 1999). Suite à un dommage de l'ADN, JMY est relocalisé dans le noyau, grâce à sa séquence NLS (« nuclear localisation signal ») et interagit avec p300/CBP dans le noyau pour amplifier la réponse de p53, la gardienne du génome (Coutts et al., 2007). JMY jouerait aussi un rôle dans la migration cellulaire. En effet, JMY a été observé au niveau des lamellipodes dans une lignée de cellules murines



et une lignée de cellules humaines (Zuchero et al., 2009). La déplétion de JMY par ARN interférents ralentit la migration de cellules humaines lors de tests de la blessure (Zuchero et al., 2009). Pourtant, une seconde étude a démontré que ce défaut de migration était dû à une augmentation de l'expression de la E-cadhérine, qui antagonise la migration favorisant les interactions cellules-cellules (Coutts et al., 2009). Ces observations suggèrent que JMY semble jouer un rôle plus indirect dans la migration cellulaire via un contrôle de l'adhésion.

Récemment, une étude récente a rapportée une relation entre les deux fonctions identifiées pour JMY: la séquence NLS se superposerait au motif VCA de JMY (Zuchero et al., 2012). Ainsi, Le mécanisme d'action de JMY proposé est le suivant. Dans le cas d'une cellule normale en migration, l'interaction de JMY avec les monomères d'actine sur ses trois domaines V masque la séquence NLS. JMY ne peut donc pas être importé dans le noyau et nucléé des filaments d'actine-F seul ou branché via Arp2/3 au lamellipode. Dans le cytoplasme, il inhiberait aussi les cadhérines, responsables des interactions cellules- cellules par un mécanisme inconnu (Coutts et al., 2009) (Figure 19a). Suite à un dommage de l'ADN, l'actine monomérique est séquestrée sous sa forme filamentueuse. La séquence NLS de JMY est libérée et JMY est importé dans le noyau et ce qui permet la réexpression des cadhérines (Coutts et al., 2009; Zuchero et al., 2012) (Figure 19b).



**Figure 19. Schéma du mécanisme d'action hypothétique de JMY.** a, Dans la cellule en migration, JMY interagit avec les monomères d'actines qui masquent la séquence NLS et permet à JMY d'initier la formation de réseaux d'actine linéaires ou branchés via l'activation du complexe Arp2/3 par sa séquence VCA libre (non représentée sur le schéma). Il inhiberait aussi la formation des cadhérines. b, Dans une cellule où l'ADN est endommagé, la cellule ne migre plus, et le stock d'actine G libre est réduit, l'actine est sous forme filamentueuse (Actine F). La séquence NLS de JMY est libérée et JMY peut alors être relocalisé dans le noyau et contribuer à la réparation de l'ADN en interagissant avec p300 qui amplifie le signal de p53. Dans le cytoplasme, l'absence de JMY permet aux cadhérines d'être relocalisées à la membrane plasmique. Inspiré de (Coutts et al., 2009; Zuchero et al., 2012)

### 3. Les inhibiteurs du complexe Arp2/3

Depuis la découverte du complexe Arp2/3 de nombreuses études se sont focalisées sur les différents facteurs permettant son activation et, aujourd'hui, la majorité d'entre eux est bien caractérisée. Cependant, les recherches sur les mécanismes d'inactivations et de modulations de la fonction d'Arp2/3 sont moins développées. Toutefois, depuis quelques années, des régulateurs négatifs du complexe Arp2/3 ont été identifiés et se sont révélés essentiels à une régulation minutieuse de la polymérisation d'actine branchée.

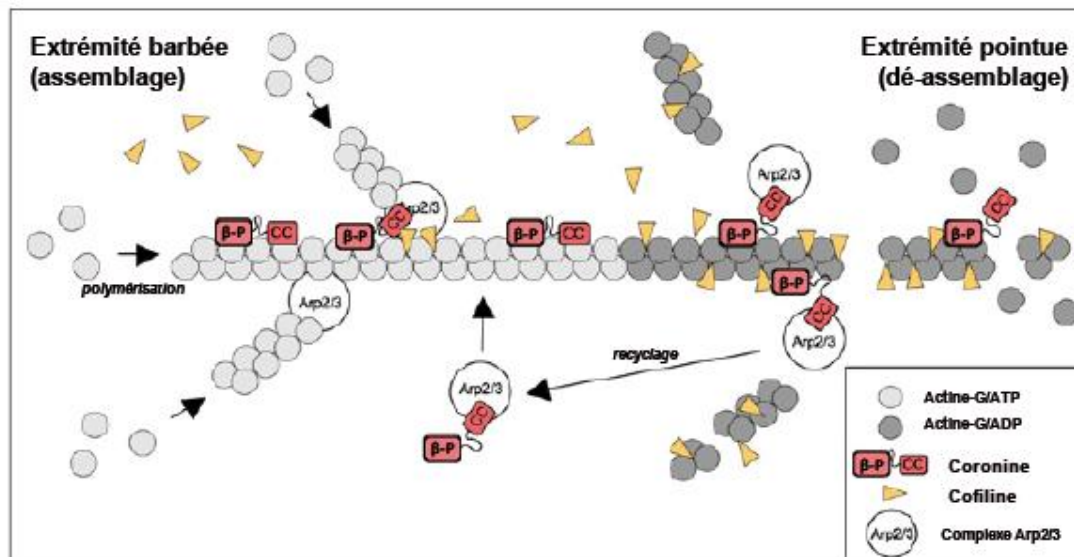
#### 3.1. Les Coronines

Les Coronines constituent une famille très conservées de protéines se liant à l'actine-F. Elles ont été identifiées la première fois chez *Dictyostelium Discoideum* chez qui la déplétion de la Coronine entraîne un défaut de migration (de Hostos et al., 1993). Les Coronines possèdent en N-terminal un domaine liant l'actine-F (domaine «  $\beta$  propeller »), une région centrale unique et un domaine coiled-coiled (CC) en C-terminal qui interagit avec le complexe Arp2/3 et l'actine-F liée à l'ATP, caractéristique des filaments nouvellement générés.

Coronin1A a été une des premières protéines rapportée comme inhibitrice du complexe Arp2/3 (Humphries et al., 2002). Chez les mammifères, le rôle inhibiteur de la Coronine a été mis en évidence par des expériences déplétions de Coronine dans les cellules induisant un réseau très dense d'actine au front de migration et réduisant la vitesse de migration (Cai et al., 2007). D'autre part, le même laboratoire a montré que Coronin1B interagit avec le complexe Arp2/3 déjà engagé dans les branches et joue un rôle important dans le recyclage des branches d'actines au lamellipode. En effet, Coronin1B est localisée au lamellipode et remodèle le réseau d'actine branché en libérant le complexe Arp2/3 des jonctions (Cai et al., 2008) (Figure 20). Ensemble, ces résultats suggèrent que Coronin1B favoriserait indirectement le recyclage de l'actine et du complexe Arp2/3 afin de permettre une protrusion efficace des lamellipodes.

Dans des cellules de mammifères et chez la levure, l'effet inhibiteur de Coronine sur Arp2/3 n'est retrouvée qu'à haute concentration (Cai et al., 2007; Liu et al., 2011). De manière intéressante, des travaux récents ont montré que, chez la levure, la Coronine était également capable d'activer le complexe Arp2/3 et ce, à faible concentration (Liu et al., 2011). En analysant la séquence de la Coronine, les auteurs ont noté la présence d'un motif CA, typique des NPFs, et qui, une fois muté, empêche l'activation du complexe Arp2/3. Coronine jouerait donc un double rôle d'activateur et d'inhibiteur du complexe Arp2/3 chez la levure, en fonction de sa concentration. A faible concentration, le motif CA de Coronine interagit avec un des sites de liaisons du complexe Arp2/3 favorisant l'accès au second site, sur lequel un NPF peut se fixer et activer le complexe Arp2/3. Au

contraire, à haute concentration, Coronine sature les sites de liaisons sur le complexe Arp2/3 et contribue à son inhibition (Liu et al., 2011). Cependant, ce mécanisme d'action serait plutôt spécifique de la Coronine de levure puisqu'une seule des sept Coronines de mammifères possède le motif CA qui permet l'activation d'Arp2/3.



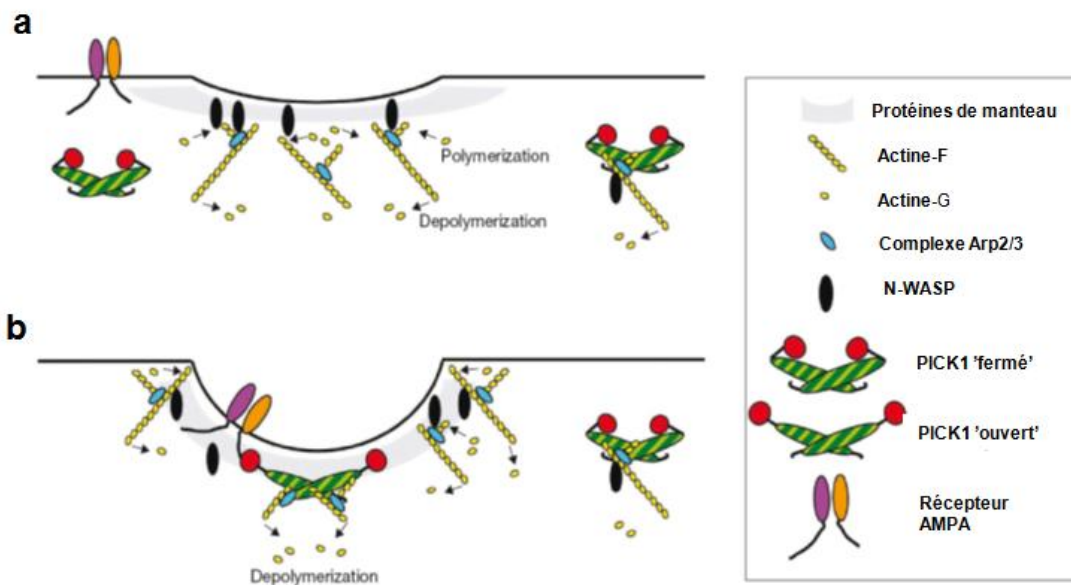
**Figure 20. Modèle du mécanisme d'action de la coronine.** A l'extrémité barbée, la Coronine interagit avec l'actine-F via son domaine  $\beta$ -propeller ( $\beta$ -P) et avec l'actine-F/ATP et le complexe Arp2/3 via son domaine coiled-coiled (CC). Cette dernière interaction empêche la Cofiline de couper les filaments d'actine. A l'extrémité pointue, où l'actine-F est liée à l'ADP, le domaine CC de la Coronine n'interagit plus avec l'actine F/ADP et permet à la Cofiline de venir se fixer sur l'actine F/ADP et de couper ces filaments d'actine. Adapté de (Gandhi et al., 2009)

### 3.2. PICK1

PICK1, pour « Protéine Interagissant avec la C-Kinase », est une protéine contenant un domaine PDZ et BAR permettant l'interaction avec l'actine-F (Rocca et al., 2008). Des analyses de séquences montrent que PICK1 contient un motif acide contenant un résidu tryptophane, tous deux caractéristiques de la queue C-terminale des activateurs d'Arp2/3. Des expériences *in vitro* montrent que non seulement PICK1 interagit avec Arp2/3 mais il est aussi capable de l'inhiber de manière dose-dépendante (Rocca et al., 2008).

*In vivo*, PICK1 a été décrite comme étant requise pour la morphologie correcte des neurones et pour empêcher une accumulation aberrante de branches d'actine dans les neurones immatures. Dans la cellule, l'inhibition du complexe Arp2/3 par PICK1 joue un rôle important dans l'endocytose des

récepteurs AMPA (amino-hydroxy-méthylisoazol-propoionate) localisés au niveau des synapses. Ainsi, PICK1 empêche la polymérisation anarchique d'actine hors des sites d'endocytoses. Une fois associé au récepteur AMPA à la membrane plasmique, PICK1 inhibe la polymérisation d'actine médiée par le complexe Arp2/3. Par conséquent, la dépolymérisation de l'actine au niveau du site d'endocytose favorise la diminution de la tension de membrane. Le domaine BAR de PICK1 ainsi que les protéines de manteaux contribuent alors à l'invagination de la membrane (Figure 21).



**Figure 21. Représentation schématique du modèle proposé de régulation de la polymérisation d'actine branchée par PICK1.** a, Le NPF N-WASP favorise la polymérisation d'actine branchée autour du site d'endocytose. PICK1 sous sa conformation 'fermée' maintient une activité basale suffisante pour empêcher la polymérisation anarchique d'actine-F en dehors du site d'endocytose. b, Quand le récepteur AMPA s'internalise, PICK1 est recrutée sur le récepteur et inhibe le complexe Arp2/3. La dépolymérisation de l'actine-F à cet endroit réduit la tension de membrane localement et permet l'invagination de cette dernière. Adapté de (Rocca et al., 2008)

Récemment, une étude a montré qu'Arf1, petite protéine de signalisation liée au GTP modulait négativement PICK1 et l'empêcherait d'interagir avec Arp2/3. Dans des conditions normales, GTP-Arf1 interagit directement avec PICK1 pour bloquer l'inhibition d'Arp2/3 et limiter l'internalisation des récepteurs AMPA. Suite à la stimulation d'un autre récepteur, le récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate), Arf1 est désactivé par l'ArfGAP GIT1. PICK1 peut alors inhiber le complexe Arp2/3 et favoriser l'internalisation du récepteur AMPA. Physiologiquement, ces réactions excessives d'internalisations des récepteurs AMPA ont pour conséquences une réduction de la taille des épines dendritiques entraînant une diminution de la force synaptique via une dépression à long-terme (LTD).

### 3.3. Gadkin

La protéine Y-BAR, initialement décrite comme impliquée dans le trafic post-Golgien (Neubrand et al., 2005), a aussi été identifiée comme inhibitrice du complexe Arp2/3 (Maritzen et al., 2012). La protéine a été renommée Gadkin pour « trans-Golgi network(TGN)/endosomally localized adaptator protein (AP)-1 associated adaptator protein » (Schmidt et al., 2009). Gadkin se lie directement à Arp2/3 via un motif acide contenant un tryptophane, motif très proche de celui retrouvé chez les NPFs. Cependant, des expériences de polymérisation *in vitro* montrent que Gadkin est ni capable d'activer le complexe Arp2/3, ni capable d'entrer en compétition avec le motif VCA d'un activateur. Dans la cellule, Gadkin colocalise avec le complexe Arp2/3 sur les endosomes. Lorsque la migration des cellules est stimulée, le complexe Arp2/3 est relocalisé à la membrane plasmique, mais ce n'est plus le cas, lorsque Gadkin est surexprimé. Cela suggère que Gadkin joue une fonction de séquestration plutôt qu'une fonction d'inhibiteur sur le complexe Arp2/3. En effet, la déplétion de Gadkin induit la redistribution d'Arp2/3 à la membrane plasmique ce qui entraîne une augmentation de l'étalement de la cellule et une augmentation de la vitesse de migration (Maritzen et al., 2012).

Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer le rôle de Gadkin dans la migration cellulaire. Au vu de son probable rôle de séquestration du complexe Arp2/3 au niveau des endosomes, il serait intéressant de voir si Gadkin affecte aussi la fonction nucléatrice du NPF WASH qui est aussi localisé aux endosomes.

## 4. Les régulateurs de la branche

D'autres protéines sont capables d'interagir directement avec le complexe Arp2/3. Cependant leur rôle n'est pas de moduler l'activité du complexe en lui-même (cf les activateurs ; les inhibiteurs), mais de moduler les filaments branchés qu'il a initié. La cortactine stabilise les branches, alors GMF et Coronine semblent favoriser plutôt le débranchement.

### 4.1. La Cortactine

#### 4.1.1. Fonctions cellulaires de la cortactine

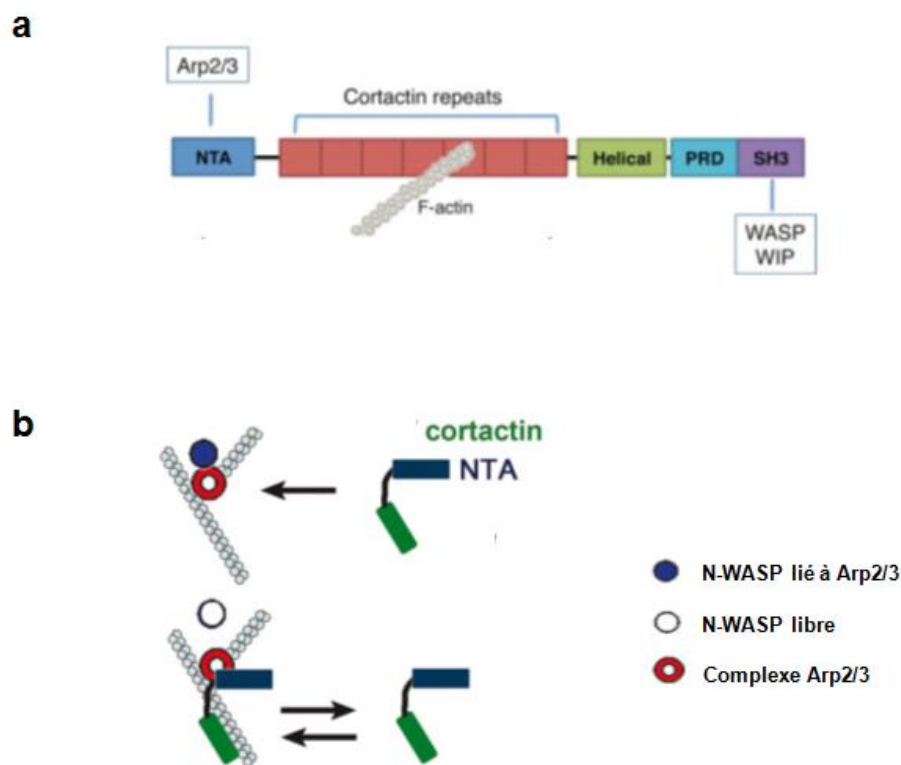
La cortactine joue un rôle important dans de nombreux processus où la polymérisation d'actine branchée est requise (lamellipodes, podosomes, motilité des vésicules intracellulaires) (Cosen-Binker and Kapus, 2006). Dans la cellule la cortactine stabilise les branches et est donc localisée au niveau de tous les réseaux d'actine branchés ce qui en fait un très bon marqueur en immunocytochimie. On la retrouve en particulier au lamellipode et au niveau des endosomes (Kaksonen et al., 2000). Au niveau des endosomes, la cortactine jouerait un rôle majeur, puisque sa déplétion empêche les endosomes de former des tubules (Puthenveedu et al., 2010). D'autre part, bien qu'elle ne soit pas indispensable à la formation du lamellipode, la cortactine contribue au maintien de la persistance de migration via la stabilisation du réseau d'actine branché (Bryce et al., 2005; Lai et al., 2009). De façon surprenante, la déplétion de la cortactine réduit l'activation de la petite GTPase Rac suggérant que la cortactine pourrait, en plus de son rôle de stabilisation, pourrait être un senseur des branches qui active en retour Rac (Lai et al., 2009).

La cortactine joue un rôle important dans les processus d'invasions tumorales. Elle favorise la formation d'invadopodes dans les cellules tumorales et des podosomes dans les cellules non-transformées. Ces structures sont des protrusions de membranes développées au niveau ventrale de la cellule qui dégradent la matrice extracellulaire grâce à la sécrétion de protéases. La déplétion de la cortactine abolie complètement la formation de ces structures (Clark and Weaver, 2008; Clark et al., 2007) probablement, en raison de la diminution de la stabilité des structures branchées requises lors de ces processus.

#### 4.1.2. Structure et mécanismes de régulation

La cortactine a été pendant longtemps considérée comme un activateur faible d'Arp2/3 (Weaver et al., 2001; Weed et al., 2000) et a été catégorisée dans la famille des NPFs de type II comprenant la cortactine et son homologue Hs1 (Haematopoietic lineage cell –Specific protein 1). La

cortactine contient des répétitions de séquences qui interagissent avec l'actine-F et un motif A en N-terminal (NTA pour « N-terminal Acide ») qui interagit avec le complexe Arp2/3. En plus, elle contient un domaine riche en proline (PRD), contenant des sites de phosphorylations permettant sa régulation; un domaine SH3 qui interagit avec N-WASP (Martinez-Quiles et al., 2004) (Figure 22a). L'activité de nucléation de la cortactine est donc très probablement liée à une coopération avec N-WASP (Kowalski et al., 2005; Martinez-Quiles et al., 2004; Tehrani et al., 2007). Des expériences *in vitro* ont montré que l'activité NPF de N-WASP était augmentée en présence de la cortactine. En effet, il semblerait que la cortactine permette la libération de N-WASP des branches et favorise ainsi un « turnover » rapide des branches pour permettre une protrusion efficace (Gov and Bernheim-Groswasser, 2012; Siton et al., 2011) (Figure 22b).

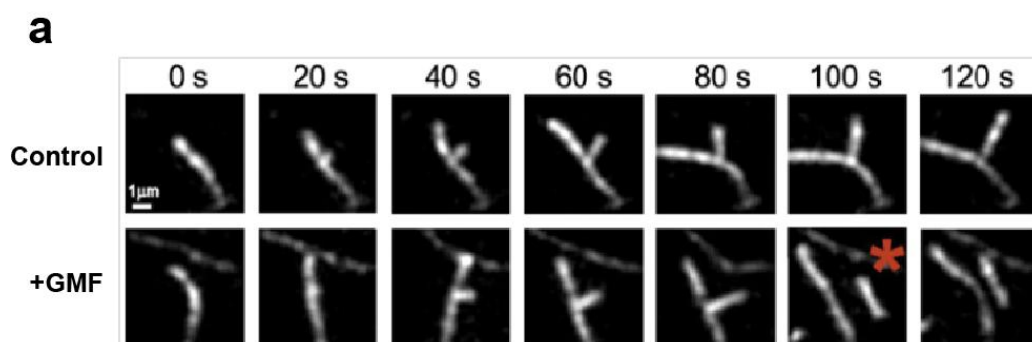


**Figure 22. Structure et modèle du mécanisme d'actine de la cortactine.** a, La cortactine contient un domaine NTA (« N-terminal Acide ») qui lui permet d'interagir avec le complexe Arp2/3, des séquences répétées qui se lient à l'actine-F, un domaine en hélice, un domaine riche en proline et un domaine SH3 en C-terminal qui permet son interaction avec N-WASP (Ren et al., 2009). b, La cortactine favoriserait le recyclage de N-WASP. Via son domaine NTA et ses séquences répétées, la cortactine est recrutée au niveau des jonctions d'actine branchées. Là, elle interagirait avec le complexe Arp2/3 lié à N-WASP et permettrait la libération de ce dernier dans le cytoplasme. Adapté de (Gov and Bernheim-Groswasser, 2012)

## 4.2. GMF

Le facteur de maturation gliale (GMF) est un homologue conservé d'ADF/cofiline basé sur la comparaison de séquences et l'homologie structurale. Cependant, les résidus permettant l'interaction avec l'actine ne sont pas bien conservés et entraînent des divergences de fonctions par rapport à ADF/cofiline. En effet, GMF ne se lie pas à l'actine-F mais interagit directement avec le complexe Arp2/3 (Gandhi et al., 2010).

*In vitro*, le mécanisme d'action de GMF diffère de la cofiline puisque GMF désassemble les branches sans les couper (Figure 23) en agissant au niveau de la jonction entre la sous-unité Arp2 du complexe Arp2/3 et le filament d'actine (Gandhi et al., 2010; Luan and Nolen, 2013; Ydenberg et al., 2013). En complément, une étude récente a aussi montrée que GMF interagissait principalement sur les branches âgées où le complexe Arp2/3 est lié à de l'ADP de manière similaire à la cofiline qui interagit avec les filaments âgés (Boczkowska et al., 2013). Ensemble, ces résultats indiquent que GMF contribuerait au recyclage du complexe Arp2/3 en désassemblant les branches âgées. Cependant, l'effet de la GMF sur l'organisation des réseaux d'actine et sur la formation des lamellipodes n'est pas encore bien connu. Des études ont montré que la déplétion de GMF diminue la vitesse de migration dans divers systèmes (Lippert and Wilkins, 2012; Zuo et al., 2013). Réciproquement, la sur-expression de GMF est associée à une augmentation de la vitesse de migration et de l'invasivité de cellules tumorales (Zuo et al., 2014).



**Figure 23. GMF favorise le débranchement des filaments d'actines.** a, Séquence d'images prises en microscopie TIRF, montrant la polymérisation d'actine fluorescente en présence d'actine-G, d'Arp2/3, de domaine VCA d'un activateur et avec ou sans GMF. L'astérisque rouge représente un événement de débranchement en présence de GMF. Extrait de (Gandhi et al., 2010).

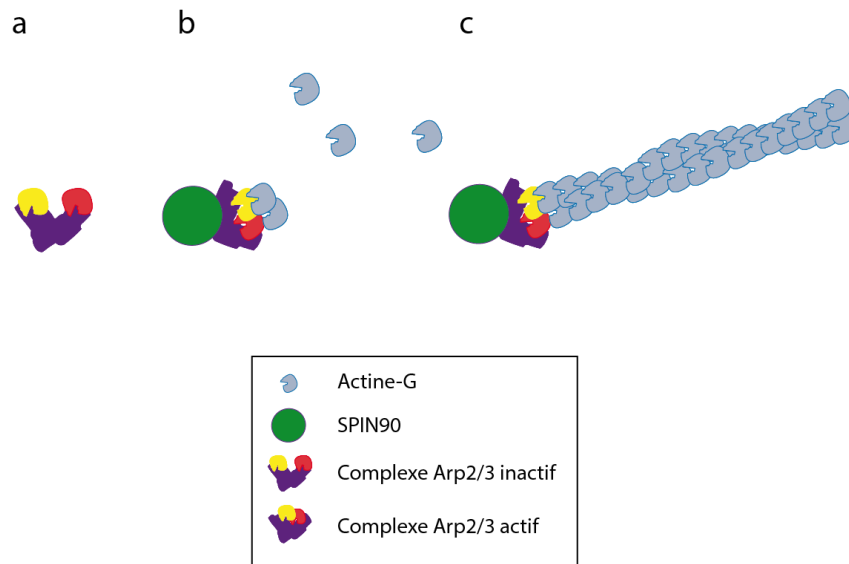


## 5. Les nouveaux régulateurs et les fonctions atypiques du complexe Arp2/3

### 5.1. SPIN90

SPIN90 aussi connu sous le nom de WISH ou DIP est un régulateur de l'actine ubiquitaire et très peu étudié, qui interagit avec le complexe Arp2/3. Contrairement aux NPFs, l'orthologue de mammifères SPIN90 ne se lie pas à un monomère d'actine-G mais il est capable d'activer le complexe Arp2/3 sans filaments préexistants (Wagner et al., 2013). En effet, le domaine riche en leucine de SPIN90 est capable de rapprocher les sous unités Arp2 et Arp3 qui miment alors l'extrémité barbée d'un filament. L'activation du complexe Arp2/3 par SPIN90 conduit alors à la formation de filaments linéaires (Fukuoka et al., 2001; Kim et al., 2006a; Wagner et al., 2013) (Figure 24).

Dans la cellule SPIN90 est localisé au front de migration et favoriserait la protrusion du lamellipode (Fukumi-Tominaga et al., 2009; Kim et al., 2006a). Il interagirait avec la kinase Src qui régule les petites GTPases Rho et Rac et serait impliqué dans la régulation des étapes d'initiations du mouvement cellulaire et l'adhésion (Meng et al., 2004; Satoh and Tominaga, 2001). Par ailleurs d'autres études ont montré qu'il jouerait également un rôle conservé dans l'endocytose médiée par les puits recouverts de clathrine (Basu and Chang, 2011; Kim et al., 2006b; Oh et al., 2013).



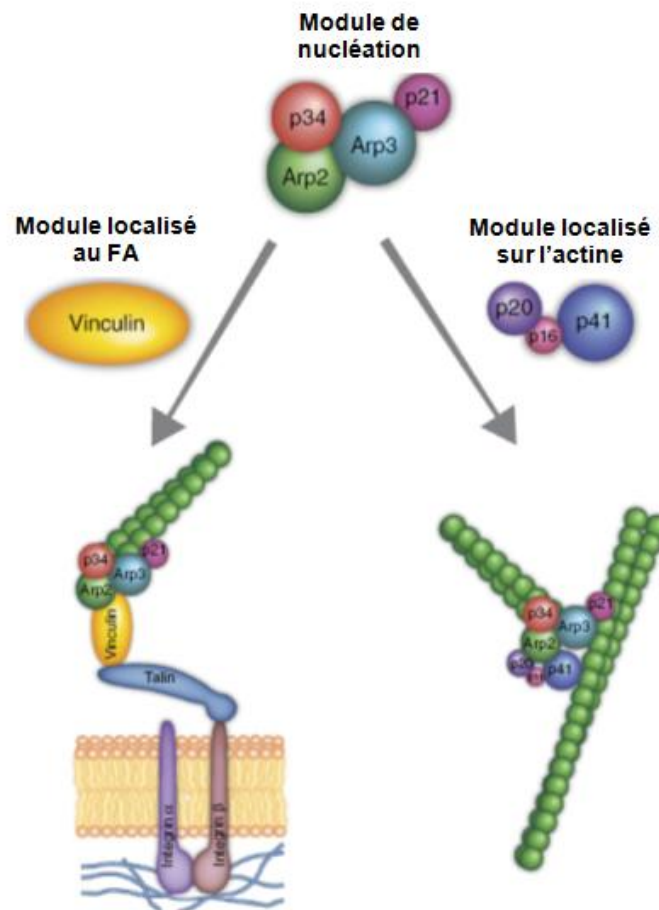
**Figure 24. Mécanisme de nucléation de SPIN90.** **a**, Le complexe Arp2/3 sous sa conformation inactive où les sous-unités Arp2 (rouge) et Arp3 (jaune) sont éloignées l'une de l'autre. **b**, SPIN90 interagit avec le complexe Arp2/3 et rapproche les deux sous unités Arp2 et Arp3. Le changement de conformation d'Arp2/3 miment alors l'extrémité barbée d'un filament qui est polymérisé via l'addition d'actine-G. **c**, Le complexe SPIN90-Arp2/3 induit la formation d'un filament d'actine linéaire.

## 5.2. Un complexe Arp2/3 hybride aux sites d'adhésions

Plusieurs études ont confirmé la présence du complexe Arp2/3 aux sites d'adhésions focales (FAs) qui médient l'interaction entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette interne (DeMali et al., 2002; Serrels et al., 2007). Des travaux ont montré l'importance de l'interaction entre le complexe Arp2/3 avec la kinase d'adhésion focale (FAK) dans la protrusion des lamellipodes et dans la formation de fibres de stress requises pour l'étalement des cellules (Serrels et al., 2007).

Récemment, une étude a caractérisé l'interaction du complexe Arp2/3 au FAs. Le complexe Arp2/3 localisé au FAs serait en fait, un complexe hybride d'Arp2/3 composé des sous-unités Arp2, Arp3, ArpC2 (p34) et ArpC3 (p21). Ce dernier interagit directement avec la vinculine, protéine clé des FAs et aboutit à la polymérisation d'actine formant les fibres de stress. La surexpression de la sous-unité ArpC1 (p41), non-recrutée dans les FAs, favoriserait la formation du complexe Arp2/3 à sept sous-unités qui génère le réseau d'actine branché. Au contraire, la déplétion d'ArpC1 favorise la formation de complexes hybrides avec la vinculine et la formation de FAs. Les auteurs suggèrent l'existence de deux sous-modules : le module de nucléation qui est celui retrouvé aux FAs et qui contient les deux sous-unités clés Arp2 et Arp3; le second permettant l'ancrage du complexe sur un filament d'actine mère (ArpC1, ArpC5 et ArpC4) (Figure 25).

En conséquence, le module de nucléation pourrait jouer le rôle de précurseur d'assemblage, tout comme il a été décrit pour Brk1 pour l'assemblage du complexe WAVE (Derivery et al., 2008). La différence d'assemblage du module de nucléation soit sur un filament d'actine, soit au FAs reste floue mais pourrait être la conséquence de variations de niveaux d'expressions des sous-unités de chaque sous-complexe.



**Figure 25. Le complexe Arp2/3 est constitué d'un module de nucléation qui est recruté au FAs ou sur un filament d'actine.** Le module fonctionnel de nucléation est constitué des sous-unités Arp2, Arp3, ArpC2 (p34) et ArpC3 (p21). Ce module est alors, soit ancré à la vinculine au niveau des adhésions focales, soit sur un filament d'actine en association avec le second sous-module constitué des sous-unités ArpC1 (p41), ArpC4 (p20), ArpC5 (p16) et permet la formation d'un filament fille. Adapté de (Chorev et al., 2014).

# Objectif de la thèse

Dans une cellule en migration, la polymérisation d'actine branchée par le complexe Arp2/3, permet de projeter la membrane plasmique dans une structure appelée le lamellipode. La voie d'activation du complexe Arp2/3 par le NPF WAVE a été bien étudiée. Cependant la migration cellulaire est un processus finement régulé et cette unique voie de signalisation semble insuffisante.

Dans le but de trouver de **nouveaux régulateurs de la migration** et en particulier de nouvelles protéines se liant au complexe Arp2/3, le laboratoire a réalisé un crible bioinformatique identifiant les protéines contenant un motif Acide. Ce dernier a abouti à l'identification d'une protéine inconnue. *In vitro*, cette protéine qui ne possède pas de motif WH2, n'active pas le complexe Arp2/3. En revanche, elle est capable d'inhiber l'activation du complexe Arp2/3 induite par le domaine WCA d'un activateur. Cette nouvelle protéine a donc été appelée **Arpin** pour « **Arp2/3 Inhibitor** ».

Le but de ma thèse était donc de caractériser cette nouvelle protéine. Dans un premier temps, j'ai cherché à **caractériser la fonction d'Arpin** dans la cellule. Après avoir montré qu'Arpin était localisée au lamellipode, j'ai étudié l'influence d'Arpin sur la protrusion des lamellipodes et analysé son rôle dans la migration cellulaire de différents types cellulaires (Dang et al., 2013). De manière intéressante cette première étude a permis d'identifier un **inhibiteur de la migration cellulaire**, via l'inhibition d'Arp2/3.

Durant cette étude nous avons montré qu'Arpin n'était pas constitutivement active dans la cellule, car elle n'est plus capable d'interagir avec le complexe Arp2/3 en absence de Rac. Nous avons également montré que l'interaction entre Rac et Arpin n'était pas probablement pas directe. Pour **comprendre comment Arpin est régulée** dans la cellule, nous avons donc cherché à identifier les protéines qui pourraient activer directement Arpin. Nous avons identifié les protéines **Tankyrases** comme **protéines interagissant de manière directe avec Arpin**. Dans un premier temps j'ai caractérisé l'interaction entre Arpin et Tankyrase, puis cherché à comprendre quelle était la fonction de cette interaction dans la cellule.

– Deuxième partie –

# Résultats

# I

## Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration

**Dang I, Gorelik R, Sousa-Blin C**, Derivery E, Guérin C, Linkner J, Nemethova M, Dumortier JG, Giger FA, Chipysheva TA, Ermilova VD, Vacher S, Campanacci V, Herrada I, Planson AG, Fetics S, Henriot V, David V, Oguievetskaia K, Lakisic G, Pierre F, Steffen A, Boyreau A, Peyriéras N, Rottner K, Zinn-Justin S, Cherfils J, Bièche I, Alexandrova AY, David NB, Small JV, Faix J, Blanchoin L, Gautreau A.

Nature. 2013 Nov 14;503(7475):281-4. doi: 10.1038/nature12611. Epub 2013 Oct 16.

Dans une cellule en migration, la polymérisation d'actine permet de projeter la membrane plasmique dans une structure protrusive appelée lamellipode. Dans le lamellipode, l'actine est polymérisée de manière branchée par le complexe Arp2/3. L'activation du complexe Arp2/3 au lamellipode est sous le contrôle du complexe WAVE. En réponse à une cascade d'activation moléculaire, une des sous-unités du complexe WAVE expose son domaine WCA (WH2-Connecteur-Acide) qui peut alors se lier au complexe Arp2/3 et l'activer afin d'initier la formation d'un nouveau filament d'actine.

Dans le but de trouver de nouveaux régulateurs de la migration et en particulier de nouvelles protéines se liant au complexe Arp2/3, nous avons réalisé un crible bioinformatique identifiant les protéines contenant un motif Acide. Ce dernier a abouti à l'identification d'une protéine inconnue. *In vitro*, cette protéine qui ne possède pas de motif WH2, n'active pas le complexe Arp2/3. En revanche, elle est capable d'inhiber l'activation du complexe Arp2/3 induite par le domaine WCA d'un activateur, et empêche la formation de branches générées par le complexe Arp2/3. Nous avons appelé cette nouvelle protéine Arpin pour « Arp2/3 Inhibitor ».

De façon surprenante, Arpin est activé et recruté par Rac au lamellipode des cellules, tout comme le complexe WAVE. De manière cohérente avec son rôle inhibiteur *in vitro*, la déplétion d'Arpin dans une lignée de cellules humaines induit une vitesse de protrusion des lamellipodes plus rapide. Ceci entraîne une migration plus rapide mais aussi plus directionnelle des cellules. En collaboration, nous avons généré des amibes (*Dictyostelium discoideum*) déficientes pour le gène homologue d'Arpin. Ces amibes mutées migrent elles aussi plus rapidement et de manière plus directionnelle que les amibes non mutées. La micro-injection de la protéine purifiée Arpin dans un système persistant et directionnel de migration, le kératocyte de poisson, induit son ralentissement suivi par un changement de direction. Arpin joue donc un rôle conservé au cours de l'évolution sur le contrôle de la migration cellulaire.

# Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration

Irene Dang<sup>1\*</sup>, Roman Gorelik<sup>1\*</sup>, Carla Sousa-Blin<sup>1\*</sup>, Emmanuel Derivery<sup>1</sup>, Christophe Guérin<sup>2</sup>, Joern Linkner<sup>3</sup>, Maria Nemethova<sup>4</sup>, Julien G. Dumortier<sup>5</sup>, Florence A. Giger<sup>5</sup>, Tamara A. Chipysheva<sup>6</sup>, Valeria D. Ermilova<sup>6</sup>, Sophie Vacher<sup>7</sup>, Valérie Campanacci<sup>8</sup>, Isaline Herrada<sup>9</sup>, Anne-Gaelle Planson<sup>8</sup>, Susan Fetics<sup>8</sup>, Véronique Henriot<sup>1</sup>, Violaine David<sup>1</sup>, Ksenia Oguievetskaia<sup>1</sup>, Goran Lakisic<sup>1</sup>, Fabienne Pierre<sup>1</sup>, Anika Steffen<sup>10</sup>, Adeline Boyreau<sup>11</sup>, Nadine Peyrières<sup>11</sup>, Klemens Rottner<sup>10,12</sup>, Sophie Zinn-Justin<sup>9</sup>, Jacqueline Cherfils<sup>8</sup>, Ivan Bièche<sup>7</sup>, Antonina Y. Alexandrova<sup>6</sup>, Nicolas B. David<sup>5</sup>, J. Victor Small<sup>4</sup>, Jan Faix<sup>3</sup>, Laurent Blanchoin<sup>2</sup> & Alexis Gautreau<sup>1</sup>

**Cell migration requires the generation of branched actin networks that power the protrusion of the plasma membrane in lamellipodia<sup>1,2</sup>. The actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex is the molecular machine that nucleates these branched actin networks<sup>3</sup>. This machine is activated at the leading edge of migrating cells by Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein (WAVE, also known as SCAR). The WAVE complex is itself directly activated by the small GTPase Rac, which induces lamellipodia<sup>4–6</sup>. However, how cells regulate the directionality of migration is poorly understood. Here we identify a new protein, Arpin, that inhibits the Arp2/3 complex *in vitro*, and show that Rac signalling recruits and activates Arpin at the lamellipodial tip, like WAVE. Consistently, after depletion of the inhibitory Arpin, lamellipodia protrude faster and cells migrate faster. A major role of this inhibitory circuit, however, is to control directional persistence of migration. Indeed, Arpin depletion in both mammalian cells and *Dictyostelium discoideum* amoeba resulted in straighter trajectories, whereas Arpin micro-injection in fish keratocytes, one of the most persistent systems of cell migration, induced these cells to turn. The coexistence of the Rac–Arpin–Arp2/3 inhibitory circuit with the Rac–WAVE–Arp2/3 activatory circuit can account for this conserved role of Arpin in steering cell migration.**

The Arp2/3 complex is activated at different cellular locations by different nucleation promoting factors (NPFs), WAVE at lamellipodia, neural WASP (N-WASP) at clathrin-coated pits, and WASP and SCAR homologue (WASH) at endosomes<sup>7,8</sup>. NPFs share a characteristic carboxy-terminal tripartite domain, referred to as the VCA<sup>9</sup>. The A (acidic) motif binds to the Arp2/3 complex and induces its conformational activation. Arp2/3 inhibitory proteins containing an A motif, PICK1 and Gadkin (also known as AP1AR and  $\gamma$ -BAR), were detected at endocytic pits and at endosomes<sup>10,11</sup>. Thus, although endocytic pits and endosomes possess antagonistic activities towards the Arp2/3 complex, it was not known whether lamellipodia contain a similar Arp2/3 inhibitory protein to counteract WAVE. To identify such a protein, we performed a bioinformatics search for proteins displaying the typical A motif of human NPFs, characterized by a tryptophan residue at the antepenultimate position in an acidic context. We identified an uncharacterized protein (C15orf38) clustered with NPFs with this procedure (Fig. 1a). This protein was named Arpin. Arpin is encoded by a single gene in metazoans and amoeba. Predictions and NMR analysis indicate that this protein of about 220 residues is structured

with the exception of its highly mobile C-terminal end, which contains the putative Arp2/3-binding site (Extended Data Figs 1 and 2). Indeed, Arpin binds to Arp2/3 mostly through its acidic motif (Fig. 1b and Extended Data Figs 3 and 4).

The molecular function of Arpin on Arp2/3 activity was assayed by spectrofluorimetry and total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy using purified proteins. Arpin was unable to activate the Arp2/3 complex, consistent with its lack of verprolin (V) and cofilin (C) homology motifs. However, when Arp2/3 was activated by VCA, Arpin, but not its truncated form lacking the acidic motif (Arpin $\Delta$ A), inhibited actin polymerization in a dose-dependent manner (Fig. 1c). The acidic peptide was sufficient for this inhibition, although it was less effective than full-length Arpin, in line with its lower affinity for the Arp2/3 complex (Extended Data Fig. 4). Arpin inhibited Arp2/3 activation, because we observed by TIRF microscopy the generation of fewer actin branched junctions in the presence of Arpin (Fig. 1d and Supplementary Video 1). Full-length Arpin and its acidic motif, but not Arpin $\Delta$ A, compete with VCA for Arp2/3 binding (Fig. 1e and Extended Data Fig. 4). Therefore, Arpin is a new competitive inhibitor of the Arp2/3 complex. The name Arpin is a mnemonic for its activity (Arp2/3 inhibition).

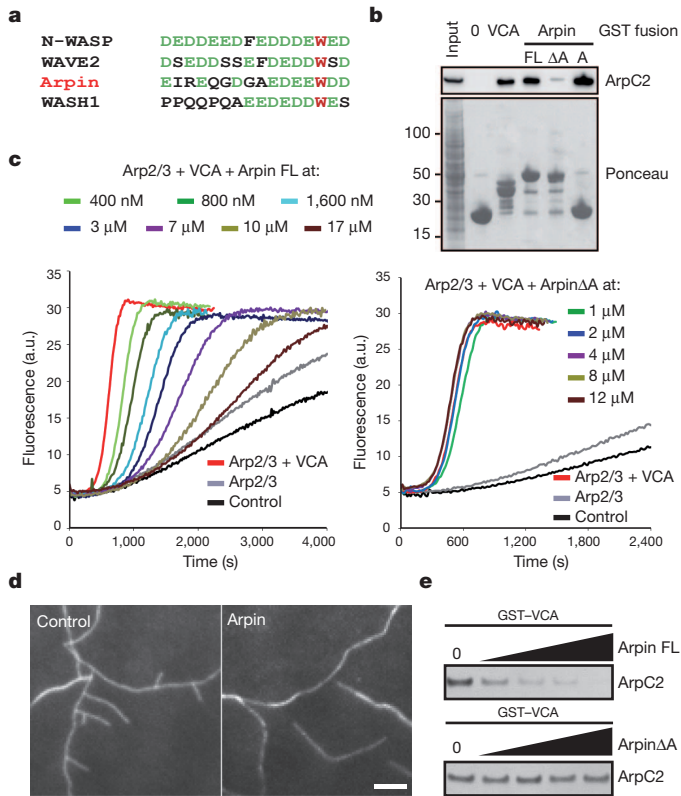
The subcellular localization of Arpin was examined by immunofluorescence in spreading mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Arpin was detected in restricted segments of the plasma membrane, which were also stained by three lamellipodial markers—the WAVE complex, the Arp2/3 complex and cortactin (Fig. 2a and Extended Data Fig. 5). Radial line scans of immunofluorescence pictures through lamellipodial outlines were generated, registered with the edge as a reference, and averaged to reveal the relative distributions of these different lamellipodial components. Arpin overlapped perfectly with the distribution of the WAVE complex, a tip component<sup>12</sup> (Fig. 2a). Arpin is thus localized at the lamellipodium tip, where new actin branches are nucleated by WAVE and Arp2/3 complexes. As expected, Arp2/3 and cortactin distribution extended rearwards compared to Arpin (Extended Data Fig. 5), because Arp2/3 and cortactin correspond to branches of the lamellipodial actin network undergoing retrograde flow with respect to the protruding membrane<sup>9,13</sup>.

To understand the regulation of Arpin activity, we examined the role of Rac, the master controller of lamellipodium formation. We co-transfected 293T cells with different forms of Rac and green fluorescent protein (GFP)–Arpin and then analysed the interaction of

<sup>1</sup>Group Cytoskeleton in Cell Morphogenesis, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS UPR3082, Gif-sur-Yvette 91190, France. <sup>2</sup>Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble 38054, France. <sup>3</sup>Institute for Biophysical Chemistry, Hannover Medical School, Hannover 30625, Germany. <sup>4</sup>Institute of Molecular Biotechnology, Vienna 1030, Austria. <sup>5</sup>INSERM U1024, CNRS UMR8197, ENS, Institut de Biologie de l'ENS, Paris 75005, France. <sup>6</sup>Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow 115478, Russia. <sup>7</sup>Oncogenetic Laboratory, Institut Curie, Hôpital René Huguenin, Saint-Cloud 92210, France. <sup>8</sup>Group Small G Proteins, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS UPR3082, Gif-sur-Yvette 91190, France. <sup>9</sup>Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie (iBiTec-S), CNRS URA2096, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette 91190, France. <sup>10</sup>Institute of Genetics, University of Bonn, Bonn 53115, Germany. <sup>11</sup>Institut des Systèmes Complexes & NeD, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR3294, Gif-sur-Yvette 91190, France. <sup>12</sup>Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig 38124, Germany.

\*These authors contributed equally to this work.



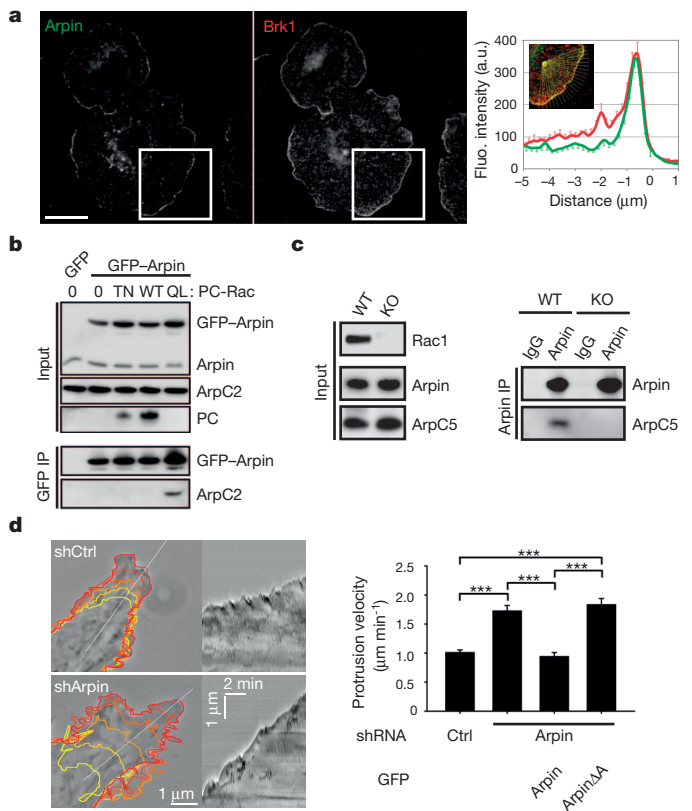


**Figure 1 | Arpin inhibits Arp2/3 activation *in vitro*.** **a**, Alignment of acidic C termini of three NPFs and of Arpin. **b**, Arpin binds to the Arp2/3 complex through its acidic C-terminal region. Glutathione S-transferase (GST) pull-down with full-length Arpin (FL), its last 16 amino-acids (A), ArpinΔA or the VCA domain of N-WASP as a positive control. ArpC2 is a subunit of the Arp2/3 complex. **c**, Spectrofluorimetry assay using pyrene-labelled actin to monitor polymerization. a.u., arbitrary units. **d**, Assembly of branched actin networks monitored by TIRF microscopy using rhodamine-labelled actin. Scale bar, 5 μm. **e**, Full-length Arpin, but not ArpinΔA (18 μM and serial twofold dilutions), competes with the NPF for Arp2/3 binding.

Arpin with the Arp2/3 complex through GFP immunoprecipitations. The active form of Rac1, which is sufficient to induce lamellipodia, was also sufficient to induce Arp2/3 co-immunoprecipitation with Arpin (Fig. 2b). To examine whether Rac is required for Arpin activation, we used Rac1 knockout MEFs that lack lamellipodia<sup>14</sup>. The absence of Rac abrogated the peripheral localization of Arpin in all knockout MEF cells examined (Extended Data Fig. 5). Endogenous Arpin was then immunoprecipitated from Rac1 knockout MEFs. The Arp2/3 complex co-immunoprecipitated with Arpin in control MEF cells, but not in Rac-deficient cells (Fig. 2c). Together, these results show that, in response to Rac signalling, Arpin inhibits the Arp2/3 complex at the lamellipodium tip, that is, where Rac also stimulates actin polymerization through the WAVE complex.

This counterintuitive finding suggests that Arpin would be a built-in brake of protrusions. Human RPE1 cells transiently transfected with short hairpin RNAs (shRNA) that efficiently deplete Arpin displayed increased lamellipodia-mediated cell spreading (Extended Data Fig. 6 and Supplementary Video 2). Arpin depletion increased protrusion velocity of lamellipodia, consistent with its Arp2/3 inhibitory role (Fig. 2d). This effect was fully rescued by Arpin re-expression, but only when Arpin contained the acidic motif. Arpin thus provides a paradoxical negative circuit downstream of Rac. Such a circuitry, where Rac induces and inhibits actin polymerization, generates an ‘incoherent feedforward loop’ (Fig. 2e), which can favour temporal regulations<sup>15</sup>.

To examine whether the Arpin circuit is physiologically relevant for cell migration, we impaired the expression of the *arpin* gene in zebrafish embryos using morpholinos. During gastrulation, prechordal plate



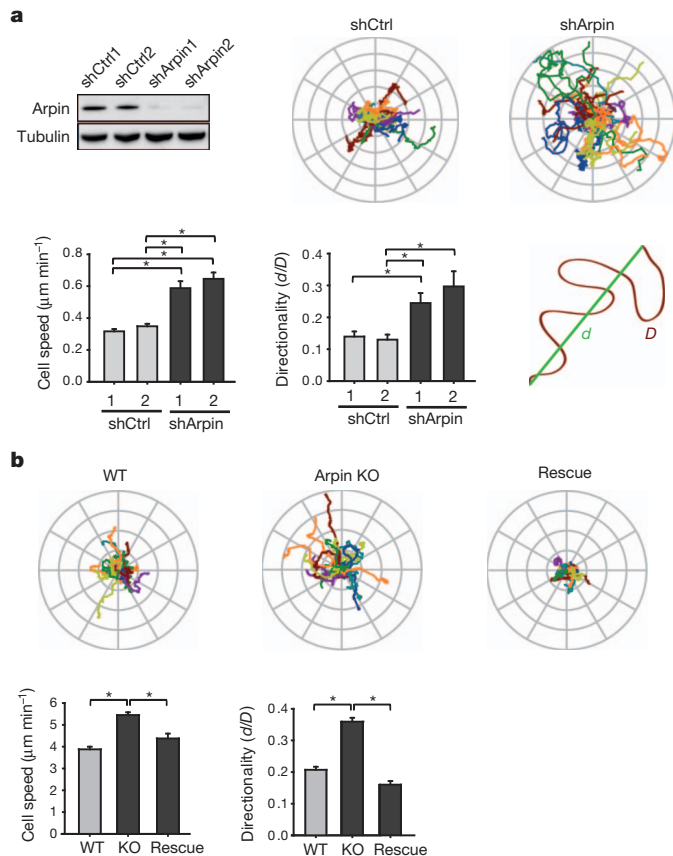
**Figure 2 | Arpin inhibits the Arp2/3 complex at the lamellipodium tip.**

**a**, Arpin colocalizes with Brk1, a subunit of the WAVE complex, at the lamellipodium tip (mean ± s.e.m., 24 line scans). Scale bar, 20 μm. **b**, Active (Gln61Leu; QL), but not wild-type (WT), nor dominant negative (Thr17Asn; TN), Rac induces Arpin association with the Arp2/3 complex. IP, immunoprecipitation. PC, protein C epitope. **c**, Rac is required for the Arpin–Arp2/3 interaction. KO, knockout. **d**, Arpin depletion increases the speed at which lamellipodia protrude. GFP–Arpin expression rescues the phenotype. Ctrl, control; shCtrl, control shRNA; shArpin, *arpin* shRNA. Data are mean ± s.e.m.;  $n = 40$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , two-tailed analysis of variance (ANOVA). **e**, Arpin circuitry.

cells collectively migrate towards the animal pole. After *arpin* loss of function, cell movements were less coordinated (Extended Data Fig. 7). Prechordal plate cell transplants revealed a cell autonomous effect of Arpin on protrusions. Protrusions were more frequent and more persistent over time in the absence of Arpin (Supplementary Video 3). This observation is consistent with the incoherent feedforward loop, a circuitry that can suppress the protrusion it creates.

To understand the role of the incoherent feedforward loop in cell migration further, we performed Arpin loss-of-function experiments in cell systems migrating as individual cells. Migration of stable Arpin-depleted clones from the breast human cell line MDA-MB-231 was analysed by video microscopy in two or three dimensions (Fig. 3a, Supplementary Videos 4 and 5, and Extended Data Fig. 8). In both cases, the tracks illustrate that Arpin-depleted cells explored a larger territory than control cells, an observation substantiated by mean square displacements (Extended Data Fig. 9). Increased exploration was not only due to increased speed, but also to increased directional persistence, measured as the ratio of the distance between two points by the actual trajectory (Fig. 3a) or as the direction autocorrelation function (Extended Data Fig. 10). Because Arpin is conserved in amoeba,



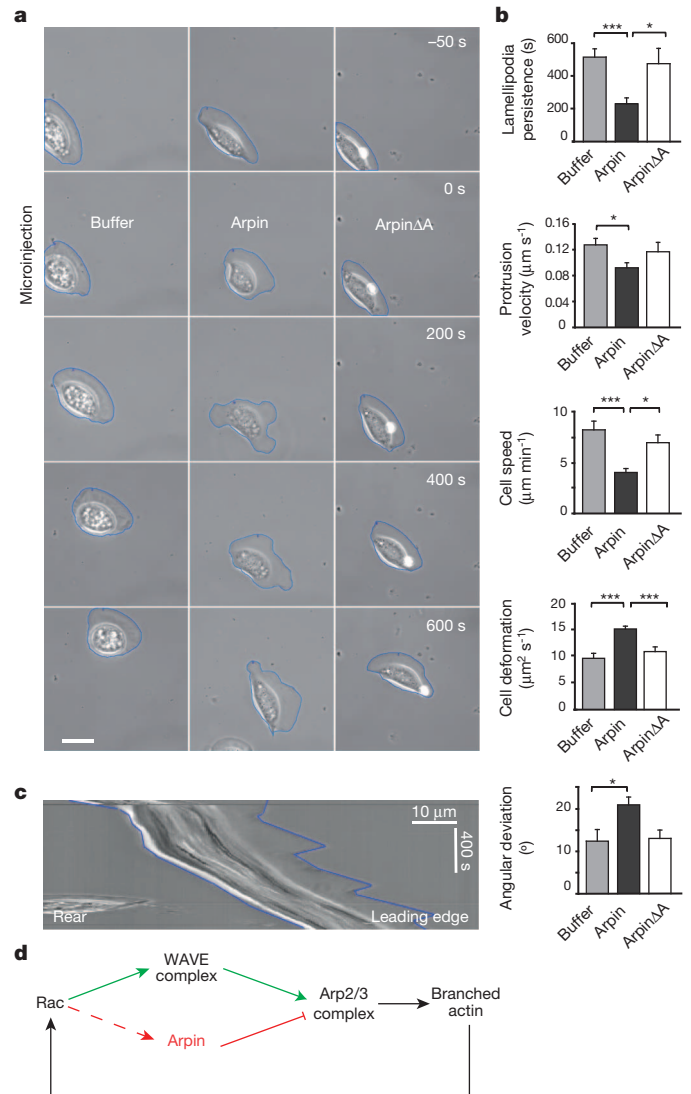


**Figure 3 | Arpin depletion increases directional persistence of migration in mammalian cells and in *Dictyostelium discoideum*.** **a**, Arpin-depleted (shArpin1 and shArpin2) MDA-MB-231 cells explore a wider territory than controls owing to increased speed and directional persistence. The directionality index is calculated as the ratio of the distance between starting and ending points ( $d$ ) by the actual trajectory ( $D$ ). Mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 24, 31, 32$  and  $26$ , respectively;  $*P < 0.05$ , two-tailed Kruskal–Wallis test. **b**, Arpin-knockout amoeba explores a wider territory than wild type owing to increased speed and directional persistence. Directionality is more than fully rescued by *Dictyostelium* Arpin expression in knockout amoeba. Data are mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 116, 196$  and  $45$ , respectively;  $*P < 0.05$ , two-tailed Kruskal–Wallis test.

we analysed its function in *Dictyostelium discoideum* by knocking out the orthologous gene. As in mammalian cells, Arpin-knockout *Dictyostelium* amoebae explored a wider territory than the controls owing to increased cell speed and directional persistence (Fig. 3b and Supplementary Video 6). However, directional persistence, which is more than fully rescued by GFP–Arpin expression, is the most affected parameter in amoeba.

Arpin could thus be a ‘steering factor’. To test this hypothesis directly in a gain-of-function experiment, we selected the fish keratocyte model. These cells are characterized by fast migration based on a wide fan-shaped lamellipodium with high directional persistence. We purified zebrafish Arpin and Arpin $\Delta A$  from *Escherichia coli* and microinjected these proteins into migrating trout keratocytes (Fig. 4a). Injection of Arpin, but not Arpin $\Delta A$ , caused keratocytes to reduce their speed and deviate from their initial direction of migration (Fig. 4b and Extended Data Fig. 10). Notably, Arpin did not prevent lamellipodia protrusion, but resulted in cycles of suppression of existing lamellipodia followed by formation of new, ectopic ones (Fig. 4c and Supplementary Video 7). Collectively, the experiments performed in different systems of cell migration support a role for Arpin in promoting cell steering: Arpin slows cells down and allows them to turn.

In a computational model of efficient and persistent cell migration, the lamellipodium spatially determines where the WAVE and the Arp2/3 complexes will next polymerize actin, thus maintaining the



**Figure 4 | Arpin microinjection induces fish keratocyte to turn.** **a**, Gallery of fish keratocytes microinjected with purified full-length Arpin, Arpin $\Delta A$  or buffer as control. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . **b**, Quantifications. Data are mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 16, 15$  and  $11$ , respectively;  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ , two-tailed ANOVA. **c**, Kymograph of the Arpin-microinjected keratocyte. **d**, Model.

front at the front over time<sup>16</sup> (Fig. 4d). Such a feedback loop, sensing where branched actin is polymerized and activating Rac as a response, has recently been identified: it involves coronin 1A and the Rac exchange factor  $\beta$ -Pix<sup>17</sup>. In this feedback system, the WAVE complex closes a positive feedback loop that maintains efficient directional migration over time, whereas Arpin closes a concurrent negative feedback loop, which induces braking and allows turning. These two nested feedback loops, positive and negative, can account for the emergence of oscillations in lamellipodium protrusion/retraction, as observed in fish keratocytes after Arpin injection (Supplementary Video 8), and for various travelling actin waves described in different systems<sup>18–21</sup>.

Other proteins were previously shown to regulate cell steering<sup>22,23</sup>. Knockdown of Rac1 or cofilin, a protein that severs and depolymerizes actin filaments, increases directional persistence of mammalian cells<sup>24,25</sup>. These proteins are required, however, for lamellipodial protrusion and actin-based motility<sup>26,27</sup>. Arpin is unique in that it regulates cell steering, while being dispensable for lamellipodial protrusion and efficient migration. Arpin is a prime candidate to fine-tune numerous physiological migrations biased by diverse cues<sup>23</sup>. Arpin also seems to have a role in preventing cells from migrating. In this respect, dissection of the

mechanisms regulating Arpin in physiology and pathology is a major challenge ahead of us.

## METHODS SUMMARY

**Arpin purification and antibody production.** Arpin was purified from *E. coli* as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein and cleaved off GST. Untagged Arpin was used for *in vitro* assays of actin polymerization, antibody generation and keratocyte injection. Rabbit polyclonal antibodies targeting full-length Arpin were purified by affinity chromatography. Immunoprecipitation of endogenous Arpin was performed using purified antibodies coupled to magnetic beads.

**Cells and imaging.** RPE1 cells were electroporated with plasmids. Plasmids encoding fusion proteins or shRNAs were transfected into MDA-MB-231 cells using liposomes. Lamellipodial dynamics and random migration were analysed with ImageJ using the plug-ins 'Kymograph' and 'MtrackJ', respectively. Live-cell imaging was performed using an inverted Axio Observer microscope (Zeiss) equipped with two chambers controlled for temperature and CO<sub>2</sub>. For Arpin localization, MEF cells were fixed with 10% TCA, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and processed for immunofluorescence. To draw radial line scans, a custom-made ImageJ plug-in was developed, edge was determined using 'Isodata' and 'Analyze particle', and then a custom-made VBA macro in Excel was used to align data relative to the edge. Keratocytes were isolated from scales of freshly killed brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and microinjected with a Femtojet (Eppendorf). Plots were drawn with SigmaPlot (SPSS) and statistics were performed with SigmaStat (SPSS).

**Online Content** Any additional Methods, Extended Data display items and Source Data are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 21 November 2012; accepted 28 August 2013.

Published online 16 October 2013.

- Wu, C. *et al.* Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* **148**, 973–987 (2012).
- Suraneni, P. *et al.* The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J. Cell Biol.* **197**, 239–251 (2012).
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186 (1998).
- Insall, R. H. & Machesky, L. M. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev. Cell* **17**, 310–322 (2009).
- Padrick, S. B. & Rosen, M. K. Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 707–735 (2010).
- Ridley, A. J. Life at the leading edge. *Cell* **145**, 1012–1022 (2011).
- Derivery, E. *et al.* The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* **17**, 712–723 (2009).
- Suetsugu, S. & Gautreau, A. Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends Cell Biol.* **22**, 141–150 (2012).
- Pollard, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451–477 (2007).
- Rocca, D. L., Martin, S., Jenkins, E. L. & Hanley, J. G. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nature Cell Biol.* **10**, 259–271 (2008).
- Maritzen, T. *et al.* Gadin negatively regulates cell spreading and motility via sequestration of the actin-nucleating ARP2/3 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 10382–10387 (2012).
- Lai, F. P. *et al.* Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* **27**, 982–992 (2008).
- Cai, L., Makhov, A. M., Schafer, D. A. & Bear, J. E. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell* **134**, 828–842 (2008).
- Steffen, A. *et al.* Rac function is critical for cell migration but not required for spreading and focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.118232> (31 July 2013).
- Hart, Y. & Alon, U. The utility of paradoxical components in biological circuits. *Mol. Cell* **49**, 213–221 (2013).
- Neilson, M. P. *et al.* Chemotaxis: a feedback-based computational model robustly predicts multiple aspects of real cell behaviour. *PLoS Biol.* **9**, e1000618 (2011).
- Castro-Castro, A. *et al.* Coronin 1A promotes a cytoskeletal-based feedback loop that facilitates Rac1 translocation and activation. *EMBO J.* **30**, 3913–3927 (2011).
- Machacek, M. & Danuser, G. Morphodynamic profiling of protrusion phenotypes. *Biophys. J.* **90**, 1439–1452 (2006).
- Weiner, O. D., Marganski, W. A., Wu, L. F., Altschuler, S. J. & Kirschner, M. W. An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol.* **5**, e221 (2007).
- Brandman, O. & Meyer, T. Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* **322**, 390–395 (2008).
- Allard, J. & Mogilner, A. Traveling waves in actin dynamics and cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 107–115 (2013).
- Ghosh, M. *et al.* Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**, 743–746 (2004).
- Petrie, R. J., Doyle, A. D. & Yamada, K. M. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 538–549 (2009).
- Pankov, R. *et al.* A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J. Cell Biol.* **170**, 793–802 (2005).
- Sidani, M. *et al.* Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J. Cell Biol.* **179**, 777–791 (2007).
- Li, A. *et al.* Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression. *Dev. Cell* **21**, 722–734 (2011).
- Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M. F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613–616 (1999).

**Supplementary Information** is available in the online version of the paper.

**Acknowledgements** A.G. acknowledges his PhD supervisor M. Arpin, the name of the here identified protein is a tribute to her mentoring. We thank G. Romet-Lemonne, E. Portnoy and F. Marletaz for suggestions. We acknowledge support from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08-BLAN-0012-CSD 8 to A.G. and L.B., ANR-08-PCVI-0010-03 to A.G., ANR-11-BSV8-0010-02 to A.G., J.C. and S.Z.-J.), Association pour la Recherche sur le Cancer (SFI20101201512 to A.G., PDF20111204331 to R.G., SFI20111203770 to N.B.D.), the Bio-Emergences IBISA facility and Fundacao para a Ciencia e a Tecnologia (SFRH/BPD/46451/2008 to C.S.-B.), the Austrian Science Fund (FWF P21292-B09 to J.V.S.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FA 330/5-1 to J.F.) and grant number 8066, code 2012-1.1-12-000-1002-064 from the Russian Ministry of Education and Science to A.Y.A.

**Author Contributions** I.D., R.G. and C.S.-B. performed videomicroscopy, analysed cell migration, analysed biochemical interactions of Arpin and its localization. E.D. wrote the bioinformatics programme that first identified Arpin. C.G. and L.B. performed *in vitro* actin polymerization and fluorescence anisotropy assays. J.L. and J.F. isolated knockout amoeba and analysed their migration. M.N. and J.V.S. micro-injected fish keratocytes. J.G.D., F.A.G. and N.B.D. characterized the Arpin phenotype in zebrafish. A.B. and N.P. determined the Arpin expression profile in zebrafish. I.H. and S.Z.-J. contributed the NMR spectrum. T.A.C., V.D.E., A.Y.A., S.V., I.B., V.C., V.D., G.L., K.O., F.P., A.-G.P., S.F. and V.H. generated DNA constructs, isolated stable cell clones, purified and characterized recombinant proteins, and performed crucial experiments for our understanding of Arpin function. A.S. and K.R. isolated the Rac1 knockout MEFs. All authors designed experiments. N.P., K.R., S.Z.-J., J.C., N.B.D., I.B., A.Y.A., J.V.S., J.F., L.B. and A.G. supervised the work in their respective research group. A.G. coordinated the study and wrote the paper.

**Author Information** Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.G. ([alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr))

## METHODS

**Plasmids.** Human and zebrafish Arpin were amplified by PCR from clones IMAGE:5770387 and IMAGE:7404342, respectively (GeneService). *Dictyostelium discoideum* DdArpin was amplified from Ax2 cDNA. Human full-length Arpin (residues 1–226), ArpinΔA (residues 1–210) or ArpinA (residues 211–226), zebrafish full-length Arpin (residues 1–226), ArpinΔA (residues 1–210), and murine N-WASP VCA fragment (residues 392–501)<sup>28</sup> were cloned into a modified pGEX vector with a TEV cleavage site between the restriction sites FseI and Ascl. For expression in mammalian cells, Arpin inserts were cloned into a compatible plasmid pcDNAm PC-GFP blue<sup>7</sup>. Zebrafish full-length Arpin was also inserted pBluescript to generate probes for *in situ* hybridization and in pCS2-GFP for rescue experiments. Human RAC1 wild-type, Thr17Asn, Gln61Leu, the Arp2/3 complex subunits ArpC5A and ArpC5B<sup>29</sup> were cloned into pcDNA5 His PC TEV blue<sup>7</sup>. For expression in amoeba, *Dictyostelium* Arpin was inserted into pDGFP-MCS-neo<sup>30</sup>. For shRNA-expressing plasmids, two hybridized oligonucleotides (MWG) were cloned into psiRNA-h7SKblast1 G1 (Invivogen) according to the manufacturer's protocol. The following target sequences were used: shArpin 1: 5'-GGAGAACTGATCGATGTATCT-3'; shArpin 2: 5'-GCTTCCTCATGT CGTCTACA-3'; shArpin 3: 5'-GCCTTCCTAGACATTACATGA-3' (targets the 3' untranslated region (UTR) of *arpin* mRNA); shArpC2 1: 5'-CATGTATGT TGAGTCTAA-3'; and shArpC2 2: 5'-GCTCTAAGGCCTATATTCA-3'. These plasmids were compared to the non-targeting control provided by Invivogen; shControl: 5'-GCATATGTGCGTACCTAGCAT-3'. All constructs were verified by sequencing.

**Protein purification.** Arpin, ArpinΔA, ArpinA and N-WASP VCA fused to GST were purified from *E. coli* BL21\* strain (Life Technologies) using standard purification protocols, dialysed against storage buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), pH 7.5), frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. When indicated, Arpin was cleaved by TEV protease off GST. Arpin bound to glutathione sepharose 4B beads was cleaved by overnight incubation at 4 °C using His-tagged TEV protease in 50 mM Tris, pH 7.5, 2 mM β-mercaptoethanol, 100 mM NaCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. TEV was removed by incubation with Ni<sup>2+</sup> beads (GE Healthcare). Arpin was further purified by size-exclusion chromatography (SEC) on a Superdex-200 column (GE Healthcare) and concentrated on Vivaspins filters. Human Arpin was used for the production of polyclonal antibodies and competition experiments. Zebrafish Arpin was similarly produced, purified and used for keratocyte injection at 7.5 μg μl<sup>-1</sup> in 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT, pH 7.5. Both proteins had an amino-terminal extension of 10 amino acids (GAMAHMGRP) after TEV cleavage. ArpinA peptide (residues 211–226 of full-length Arpin) was purchased from Proteogenix. For the SEC coupled to multiangle light scattering (SEC-MALS) characterization, proteins were separated in a 15-ml KW-803 column (Shodex) run on a Shimadzu HPLC system. MALS, quasi-elastic light scattering (QELS) and refractive index (RI) measurements were achieved with a MiniDawn Treos (Wyatt technology), a WyattQELS (Wyatt technology) and an Optilab T-reX (Wyatt technology), respectively. Molecular mass and hydrodynamic radius calculations were performed with the ASTRA VI software (Wyatt Technology) using a *dn/dc* value of 0.183 ml g<sup>-1</sup>.

**Antibodies.** Polyclonal antibodies targeting Arpin were obtained in rabbits (AgroBio) against purified human Arpin, and then purified by affinity purification on a HiTrap NHS-activated HP column (GE Healthcare) coupled to the immunogen.

ArpC2 polyclonal antibody and cortactin monoclonal antibody (clone 4F11) were from Millipore. ArpC5 monoclonal antibody (clone 323H3) was from Synaptic Systems. Brk1 monoclonal antibody (clone 231H9) was described earlier<sup>31</sup>. Tubulin monoclonal antibody (clone E7) was obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank. PC monoclonal antibody (clone HPC4) was from Roche.

**In vitro assays of actin polymerization.** Pyrene actin assays and monitoring of the branching reaction were performed as described previously<sup>32</sup>. VCA refers to the VCA domain of WAVE1 purified as described<sup>33</sup>. Conditions for Fig. 1c were: 2 μM actin (10% pyrene-labelled), 500 nM VCA, 20 nM Arp2/3 and Arpin full-length or ArpinΔA at the indicated concentrations. Conditions for Fig. 1d were: 1 μM actin (10% rhodamine-labelled), 150 nM VCA, 80 nM Arp2/3 and 5 μM Arpin when indicated.

**Fluorescence anisotropy based determination of K<sub>d</sub>.** The ArpinA peptide was synthesized and labelled with 5-TAMRA at the amino terminus (Proteogenix). The peptide was excited with polarized light at 549 nm and emitted light was detected at 573 nm using a MOS450 fluorimeter (Biologic). Measurements were made for 60 s at 1 point s<sup>-1</sup>, and the average anisotropy was calculated with the Biologic software. Fits were performed as described previously<sup>34</sup>.

**GST pull-down, immunoprecipitations, SDS-PAGE and western blots.** HeLa cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100 and 5% glycerol, pH 7.5. GST fusion protein (20 μg) associated with 20 μl of glutathione sepharose 4B beads (GE Healthcare) was incubated with

1 ml HeLa cell extracts for 2 h at 4 °C. Beads were washed and analysed by western blot.

Co-immunoprecipitation of Arpin with the Arp2/3 complex was performed with either two 15-cm dishes of MEF cells, or one 10-cm dish of transfected 293T cells. Cell lysates prepared in 10 mM HEPES, pH 7.7, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA and 1% Triton X-100 were incubated with 10 μg of non-immune rabbit IgG or 10 μg of anti-Arpin antibodies coupled to tosyl-activated dynabeads (Life Technologies) or to GFP-trap beads (Chromotek). Beads were incubated with extracts for 2 h at 4 °C, washed and analysed by western blot.

SDS-PAGE was performed using NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Life Technologies). For western blots, nitrocellulose membranes were developed using horseradish peroxidase (HRP)-coupled antibodies, Supersignal kit (Pierce) and a LAS-3000 imager (Fujifilm).

**Cells and transfections.** hTERT immortalized RPE1 cells (Clontech) were grown in DMEM/HAM F12, MEFs and 293T cells in DMEM, and MDA-MB-231 cells were grown in RPMI. All media were supplemented with 10% FBS (media and serum from PAA Laboratories). All cells and stable clones were found negative for mycoplasma infection by a sensitive PCR assay.

RPE1 cells were electroporated with ECM 630 BTX (Harvard Apparatus). Ten-million cells were resuspended in 200 μl serum-free DMEM/HAM F12 medium containing 7.5 mM HEPES, pH 7.5, mixed with 10–40 μg DNA plasmid in 50 μl 210 mM NaCl and electroporated at 1,500 μF and 250 V. To isolate stable Arpin-depleted clones, MDA-MB-231 cells were transfected with shRNA Arpin 3 or shControl using Lipofectamine 2000, and clones selected with 10 μg ml<sup>-1</sup> blasticidin (Invivogen) were isolated with cloning rings and expanded. For rescue experiments, cells transfected with shRNA 3, which targets the 3' UTR, were transfected with GFP-Arpin, which lacks UTR sequences. To validate Arpin localization, MEFs were transfected with non-targeting (D-001810-10) or Arpin targeting (J-059240-10; ON-TARGET plus siRNA, Dharmacon) using lipofectamine RNAiMax (Life Technologies), and examined after 2 days.

**Immunofluorescence and live imaging of mammalian cells.** Cells were fixed in 10% TCA, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and processed for immunofluorescence. To draw radial line scans, a custom made ImageJ plug-in was developed, edge was determined using 'Isodata' thresholding, then a custom-made VBA macro in Excel was used to align data relative to the edge. Lamellipodial dynamics and random migration were analysed with ImageJ using the plugins 'Kymograph' and 'MtrackJ', respectively. All imaging was done on an Axio Observer microscope (Zeiss) equipped with a Plan-Apochromat 63×/1.40 oil immersion objective, an EC Plan-Neofluar 40×/1.30 oil immersion objective and a Plan-Apochromat 20×/0.80 air objective, a Hamamatsu camera C10600 Orca-R<sup>2</sup> and a Pecon Zeiss incubator XL multi S1 RED LS (Heating Unit XL S, Temp module, CO<sub>2</sub> module, Heating Insert PS and CO<sub>2</sub> cover).

**Fish keratocytes.** Keratocytes were isolated from scales of freshly killed brook trout (*Salvelinus fontinalis*) as previously described<sup>35</sup> and imaged by phase contrast on an inverted Zeiss Axioscope using ×63 optics, and a halogen lamp as light source. Microinjection was performed with a micromanipulator (Leitz) and a micro-injector Femtojet (Eppendorf) controlling backpressure and injection pulses. Contours were analysed using the CellTrack software (Ohio State University).

**Zebrafish.** Embryos were obtained by natural spawning of *Tg(-1.8gsc:GFP)ml1* fish<sup>36</sup>. In these embryos, prechordal plate cells can be identified by their expression of GFP. *In situ* hybridization was performed following standard protocols<sup>37</sup>. For loss of function experiments, a morpholino directed against *arpin* (GTTGTCAT AAATACGACTCATCTTC, where the underlined anticodon corresponds to the initiating ATG codon), or a standard control morpholino (CCTCTTACCTCAG TTACAATTATA) was injected at the one-cell stage, together with histone2B-mCherry mRNAs or Lifeact-mCherry mRNAs, and GFP-Arpin mRNAs for rescue experiments. To analyse cell trajectories, confocal z-stacks were acquired every minute using a Nikon confocal spinning disk with an Evolve camera (Photometrics). Nuclei were tracked using Imaris (Bitplane). Further analyses were performed using custom routines in Matlab (MathWorks)<sup>38</sup>. All animal studies were done in accordance with the guidelines issued by the French Ministry of Agriculture (Decree no 2013-118) and have been submitted to Paris ethical committee no. 3.

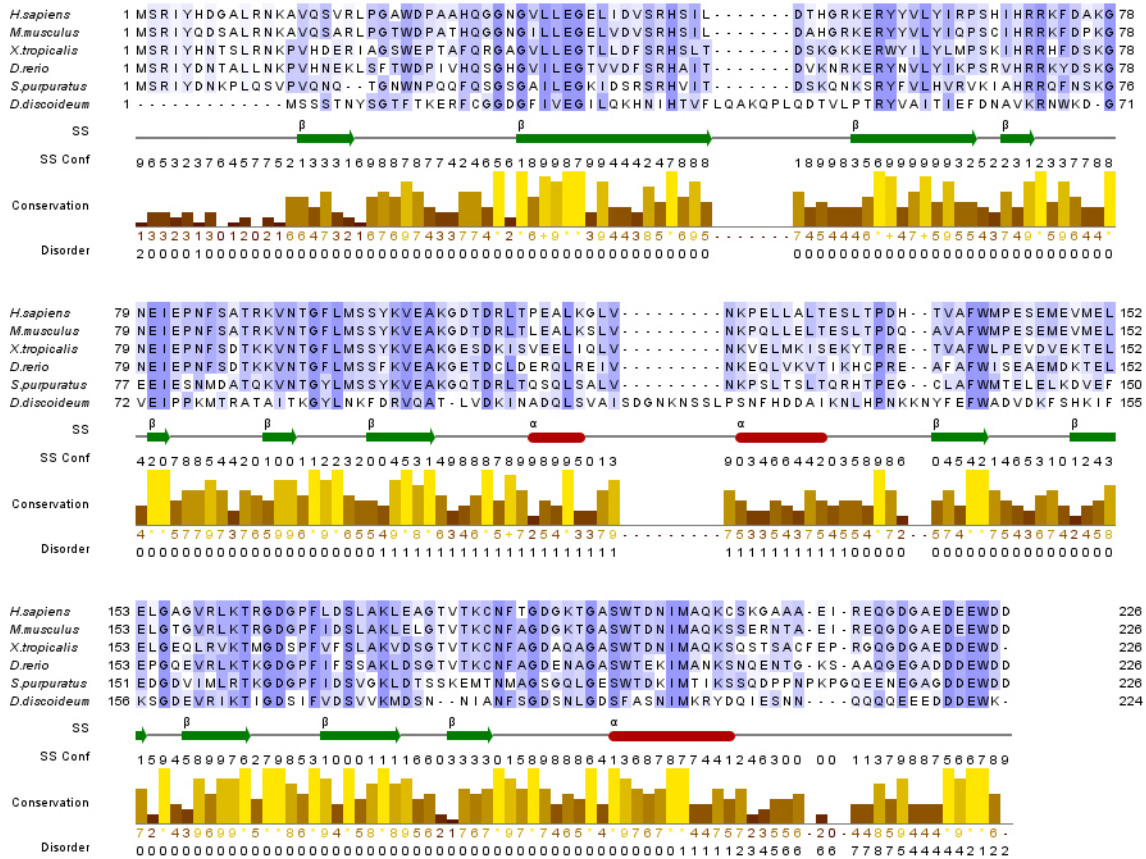
**Dictyostelium discoideum.** Cultivation and transformation by electroporation of *D. discoideum* cells was performed as described<sup>39</sup>. To knockout Arpin, a piece of genomic DNA containing the *arpin* coding sequence with its intron was amplified from Ax2 wild-type amoeba, using oligonucleotides DdArpin\_BU 5'-CGCGGATCCGCATGAGTTCAAGTACAAATTATAGT-3' and DdArpin\_SD 5'-CGCGTCGACTTTATTTCCATTCATCATCATCTTC-3'. The cloned PCR fragment was then used as a template to amplify a 5' fragment (using 5'-CGCGGATCCGCATGAGTTCAAGTACAAATTATAGT-3' and 5'-GCGCTGCAGCATCTGA AATTGCAACTGATAGTTG-3') and a 3' fragment (using 5'-GCGAAGCTTTC TTCTTTACCTTCAAATTTTCAT-3' and 5'-CGCGTCGACGTTGGTTATTT GATTCTATTTGATC-3'). These two fragments were cloned as to flank a cassette



carrying Blasticidin resistance in pLPBLP vector<sup>40</sup>. Arpin knockout clones were selected in HL5c-medium supplemented with  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  blasticidin S (Invivogen) after electroporation of the resulting vector. Recombination was assessed using diagnostic PCRs that distinguish knockout from wild-type amoeba. GFP-Arpin re-expressing knockout lines were obtained after electroporation of pDGFP-Arpin and selection with  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  geneticin (Sigma). Two time series with more than 30 cells each were acquired per amoeba. Two clones isolated after each transformation gave similar results.

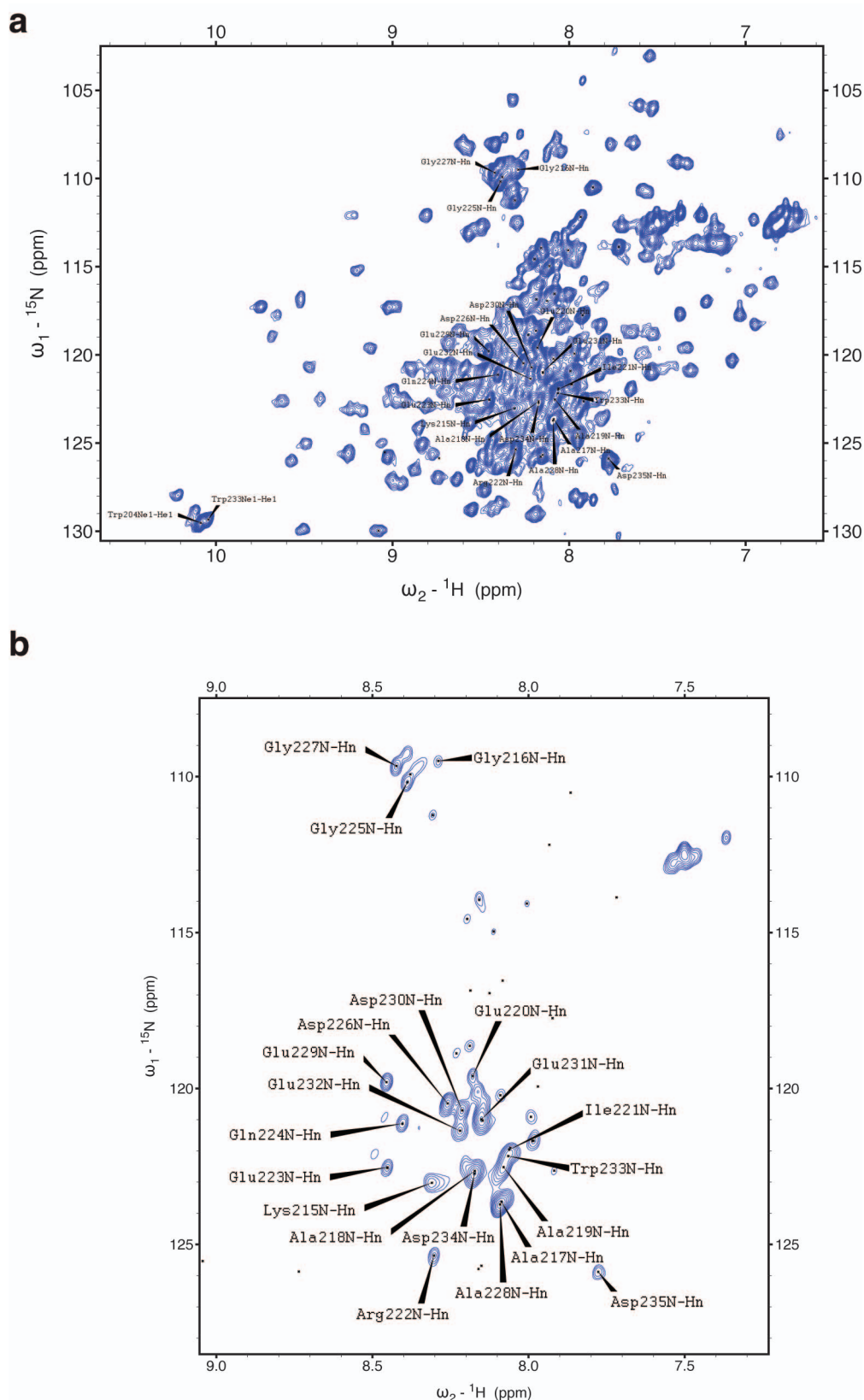
**Statistics.** Statistical analysis of the results was carried out with SigmaStat software (SPSS inc., v2.03). When data satisfied the two criteria of normality and equal variance, parametric tests were used: *t*-test to compare two groups; ANOVA for more than two. Where indicated, a bijective transformation was applied to the data to pass the two criteria of normality and equal variance. When data did not satisfy both criteria even after transformation, non-parametric tests were applied: Mann-Whitney to compare two groups; Kruskal-Wallis for more than two. A representative experiment is plotted and results are expressed as mean s.e.m. with respect to the number of cells (*n*). Differences were considered significant at confidence levels greater than 95% (two-tailed). Three levels of statistical significance are distinguished: \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

28. Lommel, S. *et al.* Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep.* **2**, 850–857 (2001).
29. Millard, T. H., Behrendt, B., Launay, S., Futterer, K. & Machesky, L. M. Identification and characterisation of a novel human isoform of Arp2/3 complex subunit p16-ARC/ARPC5. *Cell Motil. Cytoskeleton* **54**, 81–90 (2003).
30. Dumontier, M., Hocht, P., Mintert, U. & Faix, J. Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **113**, 2253–2265 (2000).
31. Derivery, E. *et al.* Free Brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex. *PLoS ONE* **3**, e2462 (2008).
32. Michelot, A. *et al.* Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* **17**, 825–833 (2007).
33. Machesky, L. M. *et al.* Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3739–3744 (1999).
34. Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D. & Higgs, H. N. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nature Cell Biol.* **3**, 76–82 (2001).
35. Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G. P. & Small, J. V. Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nature Cell Biol.* **12**, 429–435 (2010).
36. Doitsidou, M. *et al.* Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* **111**, 647–659 (2002).
37. Hauptmann, G. & Gerster, T. Two-color whole-mount *in situ* hybridization to vertebrate and *Drosophila* embryos. *Trends Genet.* **10**, 266 (1994).
38. Dumortier, J. G., Martin, S., Meyer, D., Rosa, F. M. & David, N. B. Collective mesendoderm migration relies on an intrinsic directionality signal transmitted through cell contacts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 16945–16950 (2012).
39. Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. & Faix, J. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature Cell Biol.* **7**, 619–625 (2005).
40. Faix, J., Kreppel, L., Shaulsky, G., Schleicher, M. & Kimmel, A. R. A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res.* **32**, e143 (2004).
41. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
42. Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. & Barton, G. J. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**, 426–427 (2004).
43. McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405 (2000).
44. Ward, J. J., McGuffin, L. J., Bryson, K., Buxton, B. F. & Jones, D. T. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* **20**, 2138–2139 (2004).
45. Blanchoin, L. *et al.* Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007–1011 (2000).
46. Montero, J. A., Kilian, B., Chan, J., Bayliss, P. E. & Heisenberg, C. P. Phosphoinositide 3-kinase is required for process outgrowth and cell polarization of gastrulating mesendodermal cells. *Curr. Biol.* **13**, 1279–1289 (2003).



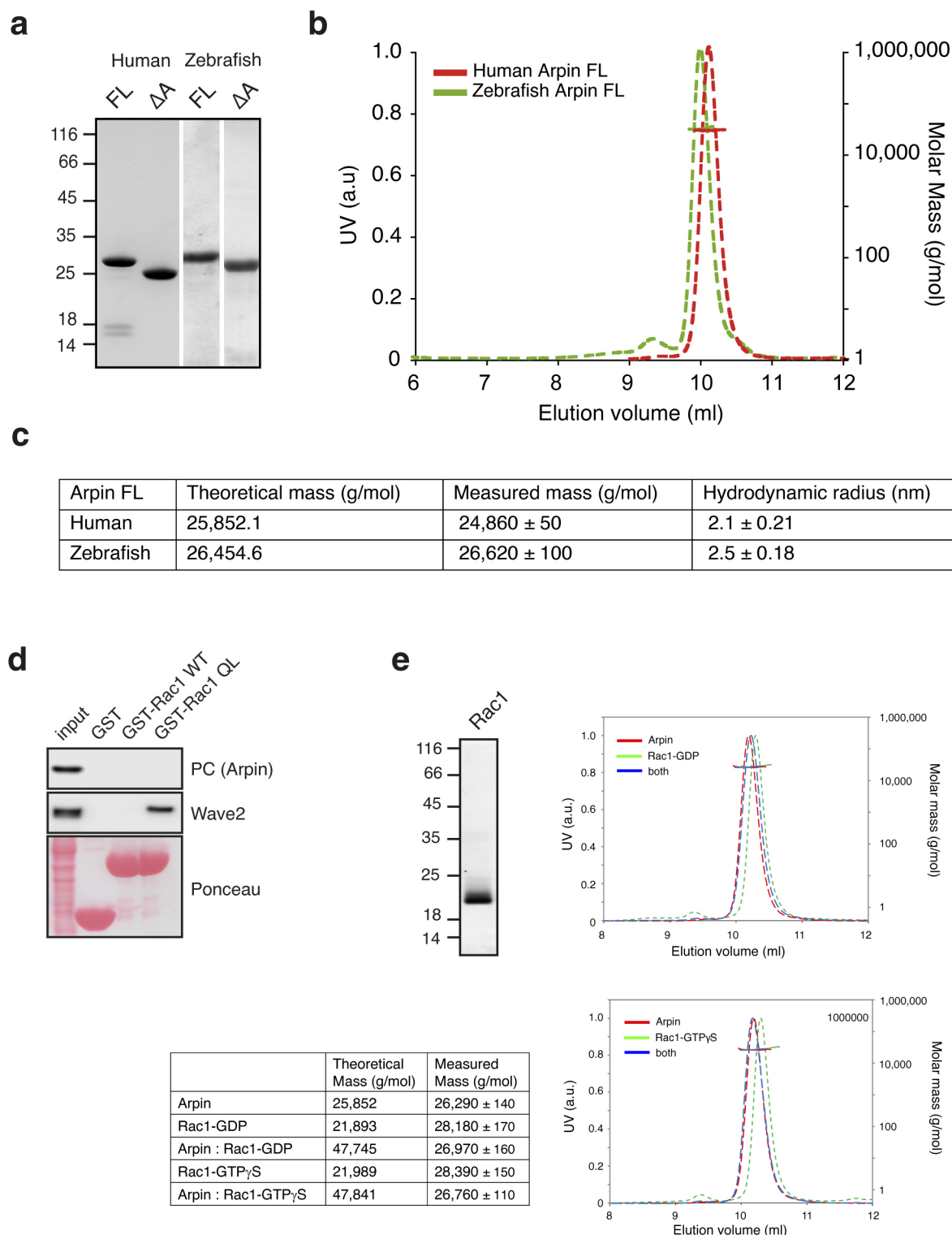
**Extended Data Figure 1 | Prediction of secondary structure elements and disordered regions of Arpin.** A multiple alignment of the Arpin orthologues was performed with MUSCLE<sup>41</sup> and displayed with Jalview<sup>42</sup>. Two methods relying on multiple alignments of Arpin orthologues were used to predict secondary structures and disordered regions, Pspired<sup>43</sup> and Disopred<sup>44</sup>, respectively. The predicted secondary structure (SS) elements are indicated by green arrows for  $\beta$ -strands, red cylinders for  $\alpha$ -helices, and a black line for coils;

the associated confidence (conf) score is displayed below, ranging from 0 to 9 for poor and high confidence, respectively. Amino acid conservation is indicated by a 0 to 10 score, and highlighted by brown to yellow histogram bars. The confidence in predicting disorder is also scored from 0 to 10, by multiplying tenfold the Disproped probability. Arpin is predicted to be a structured protein with the notable exception of the 20 C-terminal residues, which are predicted to be disordered with high confidence.



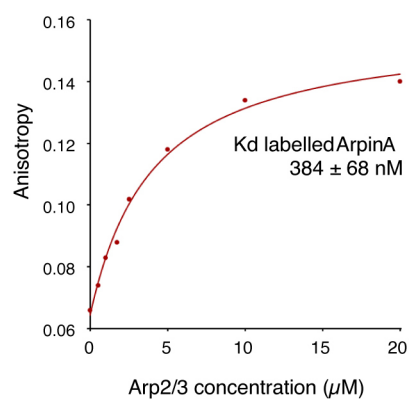
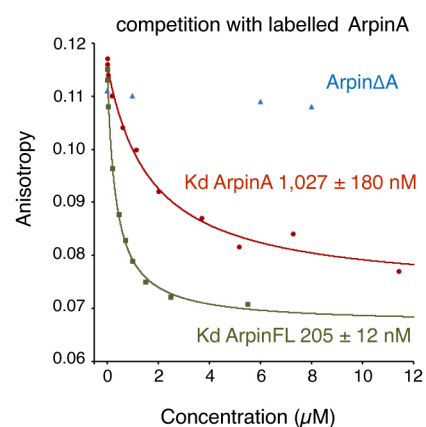
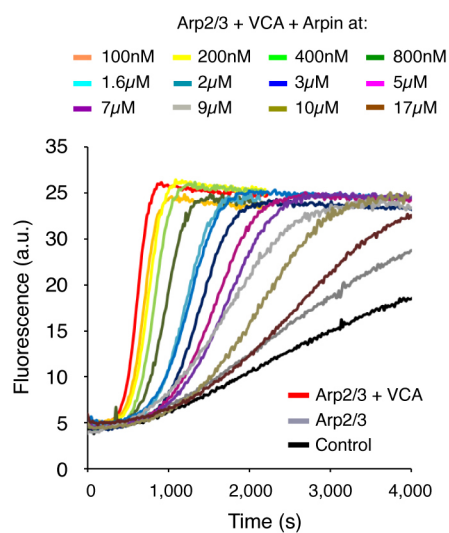
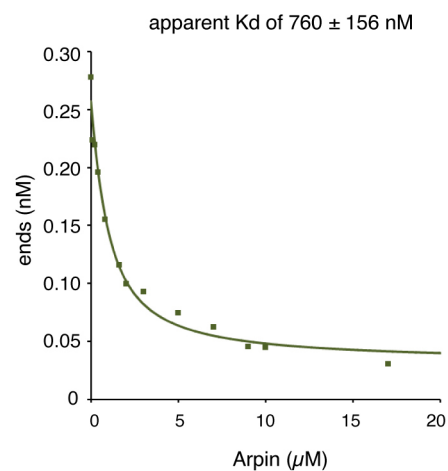
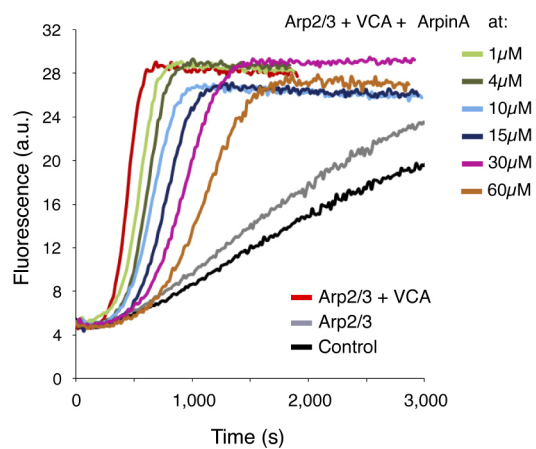
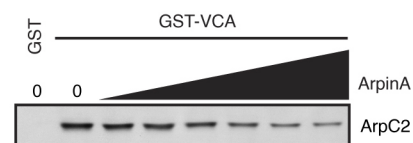
**Extended Data Figure 2 | NMR analysis of  ${}^{15}\text{N}$ -labelled human Arpin.** Both views represent  ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$  heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra. Each peak corresponds to the  ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$  backbone amide bond of a specific residue. The position of a  ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$  peak in the spectrum depends on the chemical environment of the corresponding residue. **a**, Such a scattered distribution of peaks is characteristic of a folded protein. The last 20 residues were assigned to individual peaks and are displayed on the spectrum. These

residues are clustered in the centre of the spectrum. **b**, Same HSQC spectrum displayed with a higher threshold to display only high peaks. The height of a peak depends on the mobility of the residue on a picosecond to millisecond timescale. This spectrum experimentally demonstrates that the 20 C-terminal residues are highly mobile. This result confirms that, as predicted, the Arp2/3-binding site of Arpin is exposed as a poorly structured tail of the protein.



**Extended Data Figure 3 | Characterization of recombinant Arpin.** **a**, Full-length Arpin or Arpin $\Delta$ A from human or zebrafish cDNA was expressed in *E. coli* and purified. Purity was assessed by SDS-PAGE and coomassie staining. These proteins were used for *in vitro* actin polymerization assays and for fish keratocyte injection, respectively. **b**, Analysis of the molar mass of full-length Arpins by size-exclusion chromatography coupled to multiangle light scattering (SEC-MALS). The ultraviolet measurement (left axis, dashed line) and the molar mass (right axis, horizontal solid line) were plotted as a function of column elution volume. **c**, SEC-MALS measures of masses indicate that both proteins are monomeric in solution. **d**, GST pull-down using a lysate of 293 cells overexpressing PC-tagged Arpin and purified GST-Rac1 wild type,

GST-Rac1(Gln61Leu) or GST alone as a negative control. Arpin did not associate with either type of Rac. By contrast, the endogenous WAVE complex bound to Rac(Gln61Leu), but not Rac wild type, as expected from a Rac effector. **e**, Untagged Rac1 was purified from *E. coli* and then loaded with either GDP or GTP $\gamma$ S. Human Arpin (60  $\mu$ M), Rac1 (120  $\mu$ M) and mixture of these two proteins were analysed by SEC-MALS as above. SEC was run in 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.4. The height of ultraviolet peaks was normalized to 1 to be displayed on the same figure. A single peak was detected in all cases. The measured masses indicate that no complex is formed between Arpin and Rac and that the single peak observed in the mixture corresponds to cofractionation of the two proteins of similar mass by SEC.

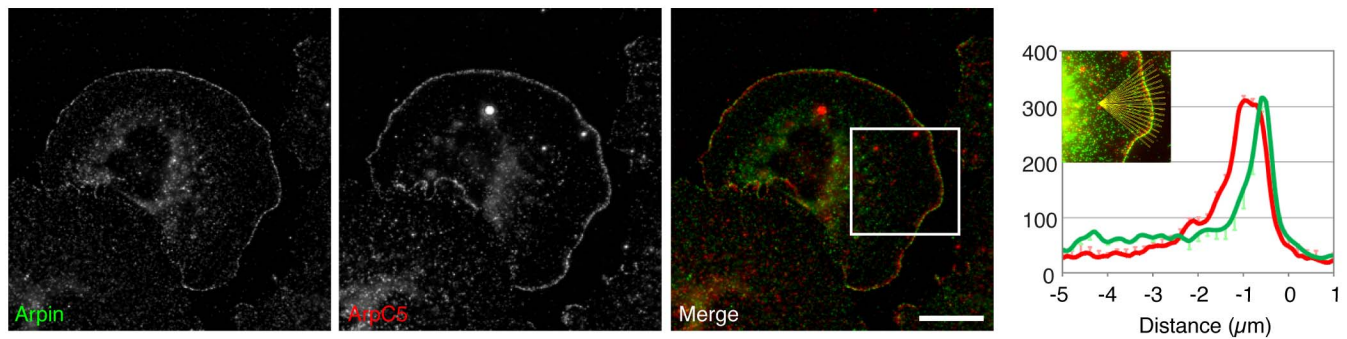
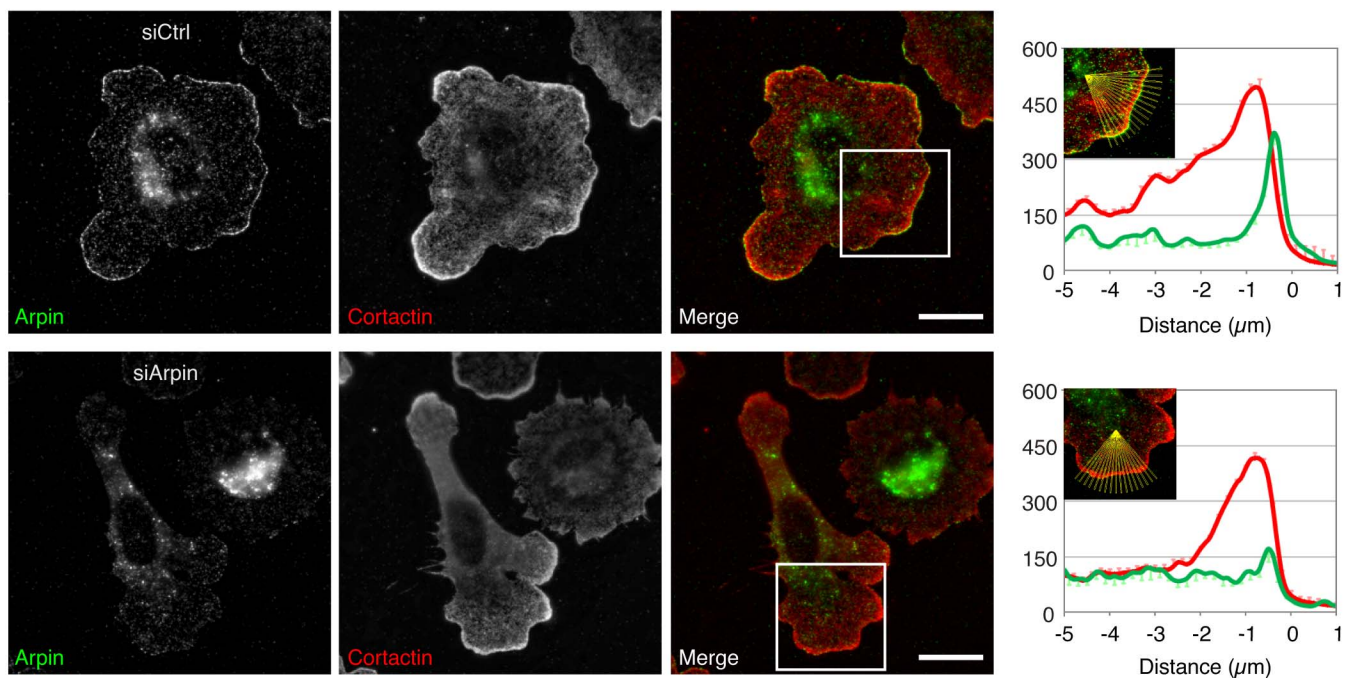
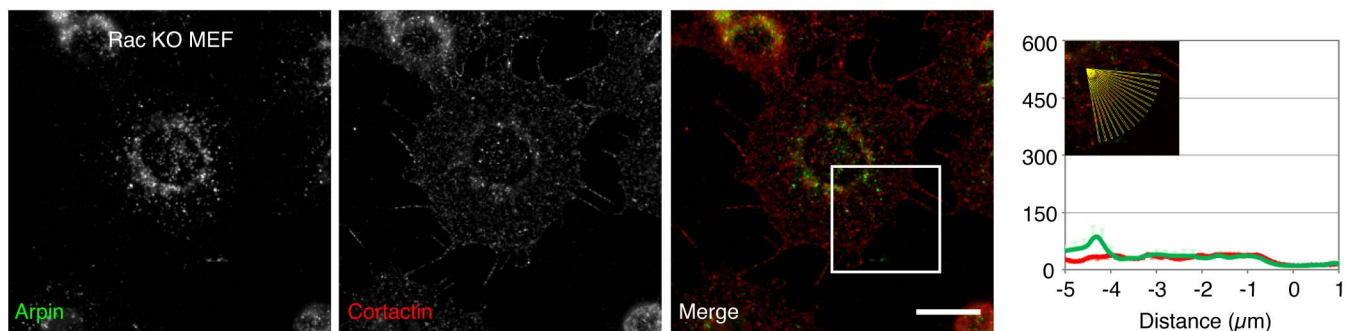
**a****b****c****d****e****f**



**Extended Data Figure 4 | Arpin directly binds to the Arp2/3 complex.**

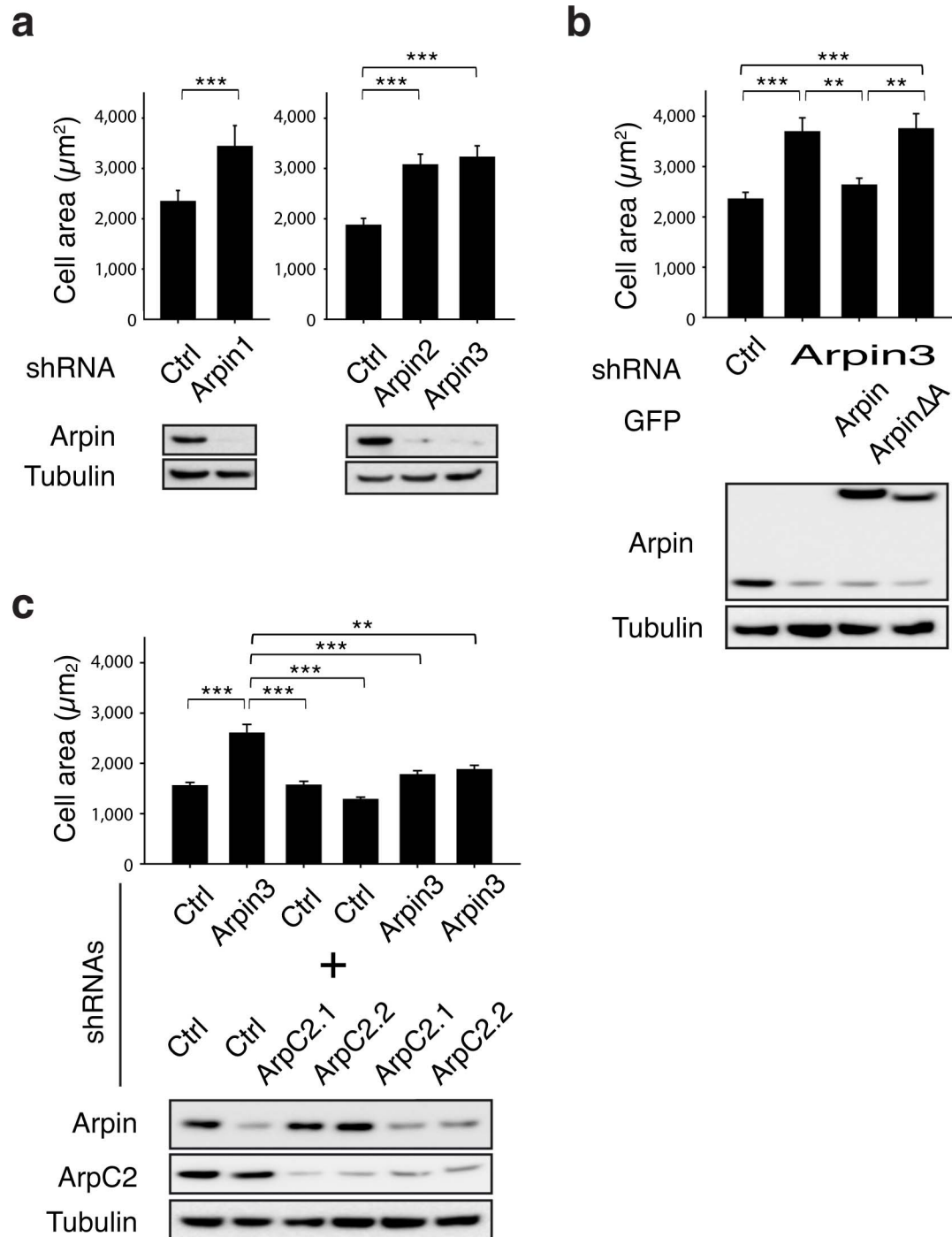
**a**, Fluorescence anisotropy measurements of labelled ArpinA peptide binding at equilibrium to the purified Arp2/3 complex at the indicated concentrations. **b**, Labelled ArpinA peptide bound to the Arp2/3 complex was then titrated with purified Arpin full-length, Arpin $\Delta$ A or unlabelled ArpinA peptide as indicated. Full-length Arpin displaces the labelled ArpinA peptide more efficiently than the A peptide. Arpin $\Delta$ A is unable to displace the ArpinA peptide. Curves that best fit the values yield the indicated equilibrium constants. **c**, Arpin inhibits Arp2/3 activation in the pyrene-actin assay. Part of this experiment is displayed in Fig. 1c, more curves are plotted here. **d**, From curves in **c**, the number of actin

barbed ends is calculated from the slope at half-polymerization using the relationship described previously<sup>45</sup>. Best fit of the values indicate an apparent  $K_d$  value of  $760 \pm 156$  nM for the Arp2/3 complex in a mixture including actin and the VCA. **e**, ArpinA inhibits Arp2/3 activation in a dose dependent manner in the pyrene-actin assay. Conditions: 2  $\mu$ M actin (10% pyrene-labelled), 500 nM VCA, 20 nM Arp2/3 and ArpinA at the indicated concentrations. **f**, ArpinA competes with the NPF for Arp2/3 binding. Arp2/3 is displaced from its interaction with 5  $\mu$ M GST N-WASP VCA immobilized on glutathione beads by the Arpin acidic peptide (304  $\mu$ M and serial twofold dilutions).

**a****b****c**

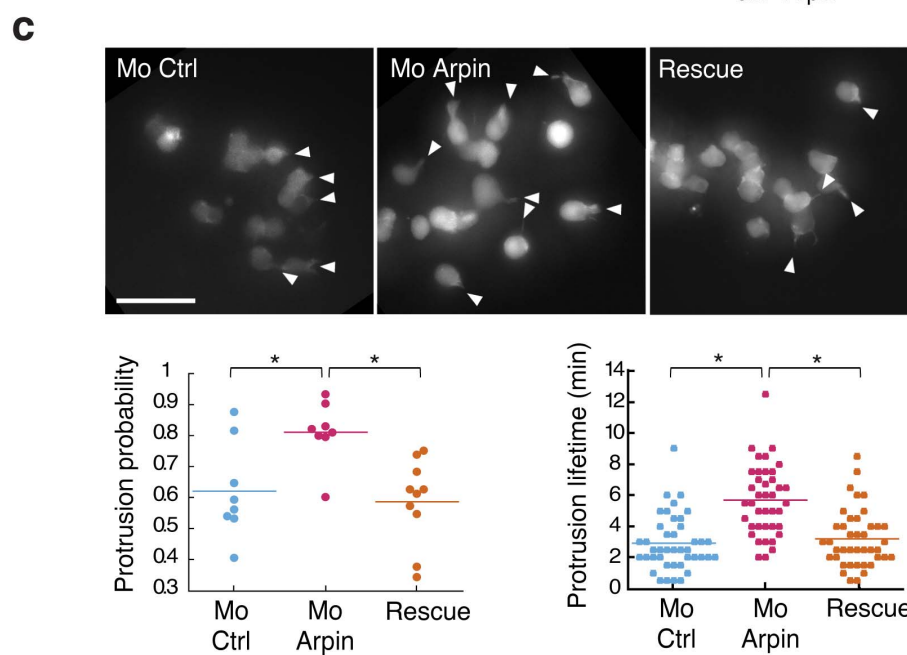
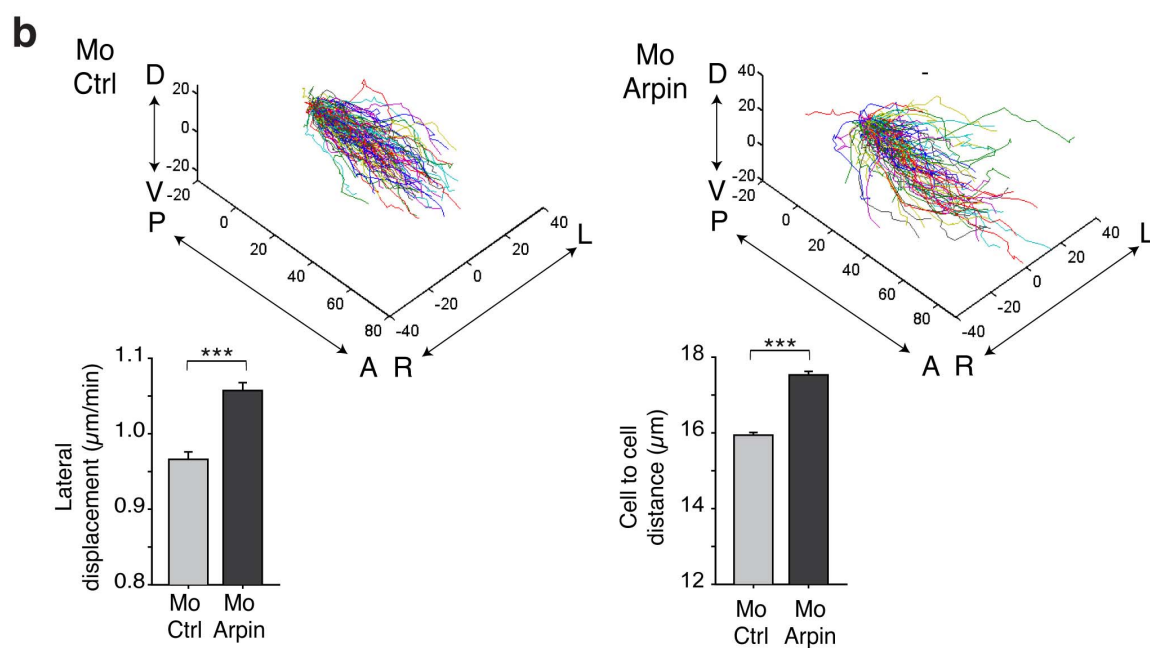
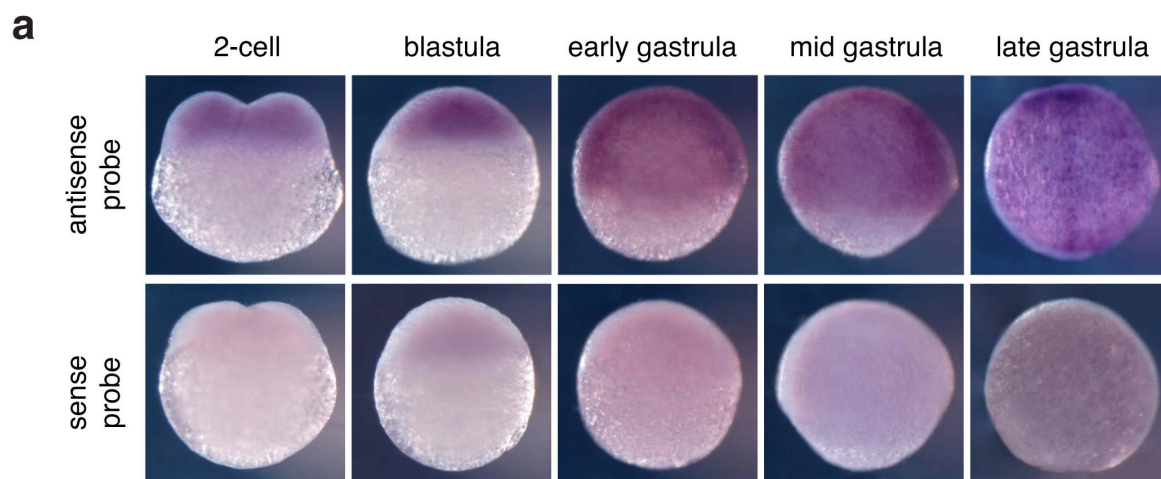
**Extended Data Figure 5 | Specific localization of Arpin at the lamellipodium tip.** **a**, Arpin overlaps with the Arp2/3 complex at the lamellipodium tip. **b**, Arpin overlaps with cortactin at the lamellipodium tip. Arpin staining is lost after short interfering RNA (siRNA)-mediated depletion. Intensity profiles along multiple line scans encompassing the cell periphery were registered to the outer edge of the staining of a lamellipodial marker. This marker was Arpin in **a** and cortactin in **b**. The multiple line scans were then averaged and displayed as an intensity plot, where the  $y$  axis represents fluorescent intensity, arbitrary units (mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 17$ , 16 and 17, respectively). Scale bar, 20  $\mu$ m. Arp2/3 localization extends rearwards relative to Arpin localization. This result is because the Arp2/3 complex becomes a branched junction when activated by the WAVE complex at the lamellipodium

tip. The branched junction undergoes retrograde flow like actin itself due to actin filament elongation<sup>9,12</sup>. Cortactin recognizes Arp2/3 at the branch junction and is thought to stabilize branched actin networks<sup>13</sup>. As a marker of the branched junction, cortactin stains the width of lamellipodia, like the Arp2/3 complex. **c**, Rac1 knockout MEFs that lack lamellipodia<sup>14</sup> are completely devoid of Arpin staining at the cell periphery, in line with the complete absence of lamellipodia indicated here by the absence of cortactin staining. Arpin is normally expressed in the Rac1 knockout MEFs (see Fig. 2c). Intensity profiles along multiple line scans encompassing the cell periphery were averaged after manual drawing of the cell edge (mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 16$ ). Scale bar, 20  $\mu$ m.



**Extended Data Figure 6 | Arpin regulates cell spreading through its interaction with the Arp2/3 complex.** Arpin was depleted from human RPE1 cells after transient transfection of shRNA plasmids and blasticidin-mediated selection of transfected cells. After 5 days, cells were either analysed by western blot or used for the spreading assay. Cells were serum-starved for 90 min in suspension in polyHEMA-coated dishes and then allowed to spread on collagen-I-coated coverslips for 2 h. Phalloidin staining was used to calculate cell surface area of individual cells using ImageJ. Mean  $\pm$  s.e.m.; \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001;  $t$ -test or ANOVA when more than two conditions. **a**, Arpin

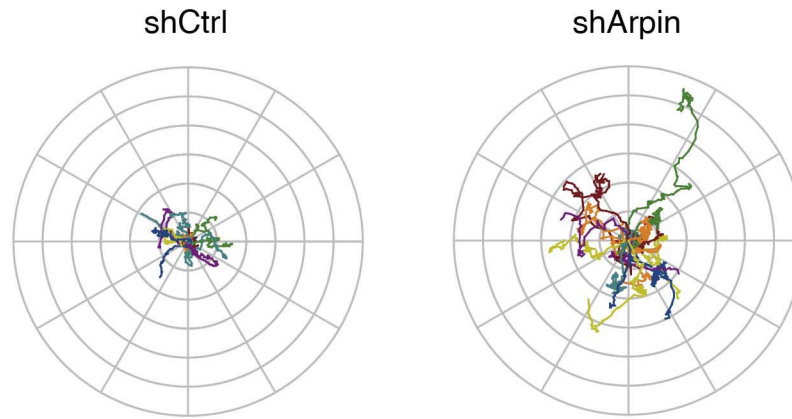
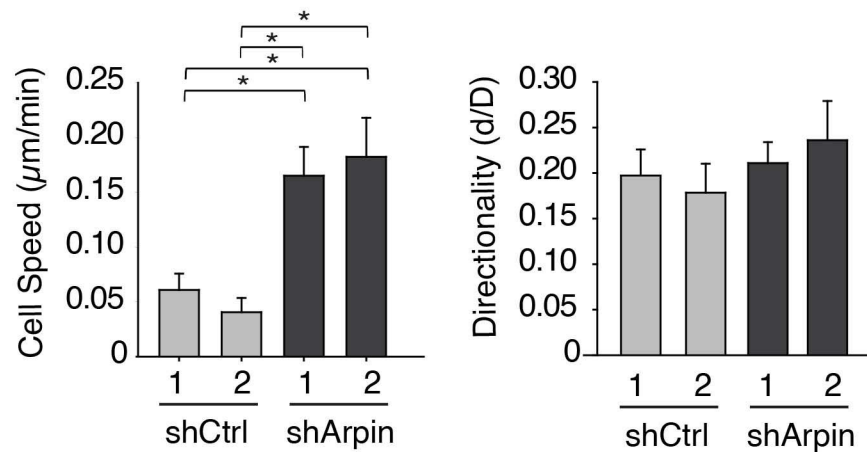
depletion increases cell spreading ( $n$  = 57 and 52, respectively). The same effect is obtained with three shRNAs targeting Arpin ( $n$  = 51, 48 and 59, respectively). **b**, This effect is rescued by GFP–Arpin expression in knockdown cells, but not by GFP–ArpinΔA expression ( $n$  = 63, 56, 63 and 52, respectively). **c**, Combined depletion of Arpin and the Arp2/3 complex reverses the phenotype of Arpin depletion. The effect is seen with two shRNAs targeting ArpC2 ( $n$  = 56, 60, 69, 68, 63 and 66, respectively). The last two experiments indicate that Arpin exerts its effect on cell spreading through its ability to regulate the Arp2/3 complex.



**Extended Data Figure 7 | Arpin regulates protrusion frequency of prechordal plate cells and their collective migration in zebrafish embryos.**

**a**, *In situ* hybridization of *arpin* probe in zebrafish embryos at different stages. *arpin* mRNAs are maternally deposited. During gastrulation, *arpin* is expressed in hypoblast, which includes the prechordal plate. **b**, Three-dimensional trajectories of prechordal plate cells in embryos injected with control or *arpin* morpholino. During fish gastrulation, prechordal plate cells migrate collectively in a straight direction from the margin of the embryo towards the animal pole<sup>38,46</sup>. Loss of *arpin* function induces dispersion as evidenced by increased lateral cell displacement ( $n = 1,516$  and  $1,546$ ) and a higher distance between cells ( $n = 194$  and  $235$ ). Lateral displacement is the cell movement perpendicular to main direction of the migration. Distance between cells refers to the average distance of the nucleus of a given cell to the nuclei of its five closest neighbours. Mean  $\pm$  s.e.m.; \*\*\* $P < 0.001$ ,  $t$ -test. **c**, At the onset of

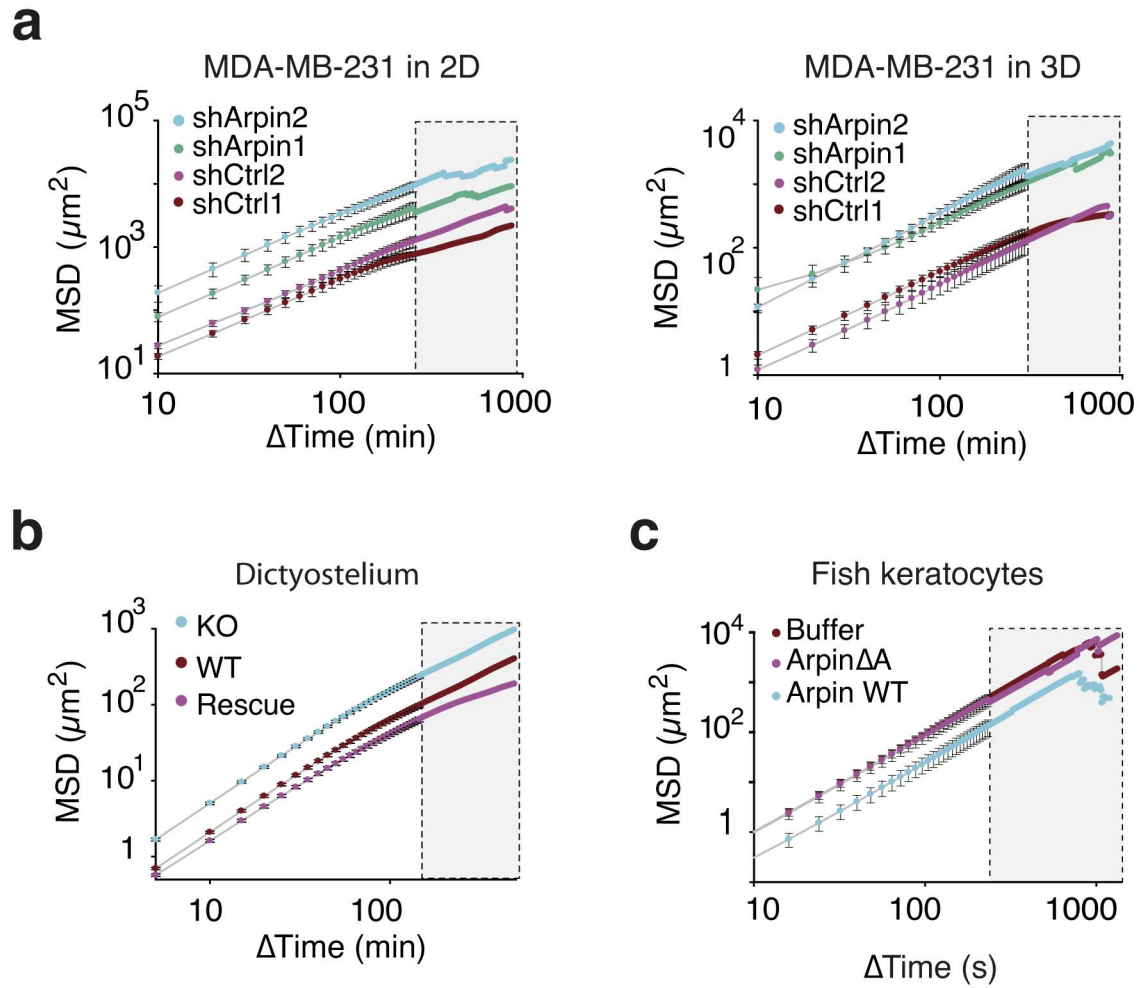
gastrulation prechordal plate cells derived from morpholino injected embryos were transplanted into the prechordal plate of an untreated host embryo at the same stage in order to allow imaging of cell autonomous effects on protrusion formation. Donor embryos are injected with control or *arpin* morpholinos and mRNAs encoding Lifeact-mCherry as well as GFP-Arpin for the rescue. Time-lapse imaging of injected cells is performed by epifluorescence to reveal Lifeact, a marker of filamentous actin, which stains actin-based protrusions. For each cell, presence of a protrusion was assessed at each frame to deduce probability of protrusion presence and protrusion lifetimes. *arpin* loss of function increases the probability of presence of protrusions ( $n = 8, 8$  and  $10$ , respectively; \* $P < 0.05$ , ANOVA) and their duration (in this case,  $n$  corresponds to the number of protrusions ( $n = 42, 41$  and  $40$ , respectively; \* $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis). Protrusions are indicated by arrowheads. Scale bar,  $50 \mu\text{m}$ .

**a****b**

**Extended Data Figure 8 | Arpin depletion increases cell migration in three dimensions.** Stable MDA-MB-231 clones depleted of Arpin or not were embedded in a collagen gel. **a**, Single-cell trajectories illustrate that control cells hardly move in this dense environment (see Supplementary Video 4), unlike Arpin-depleted cells, which explore a significant territory, albeit at lower pace than in two dimensions, as evidenced by mean square displacement (Extended

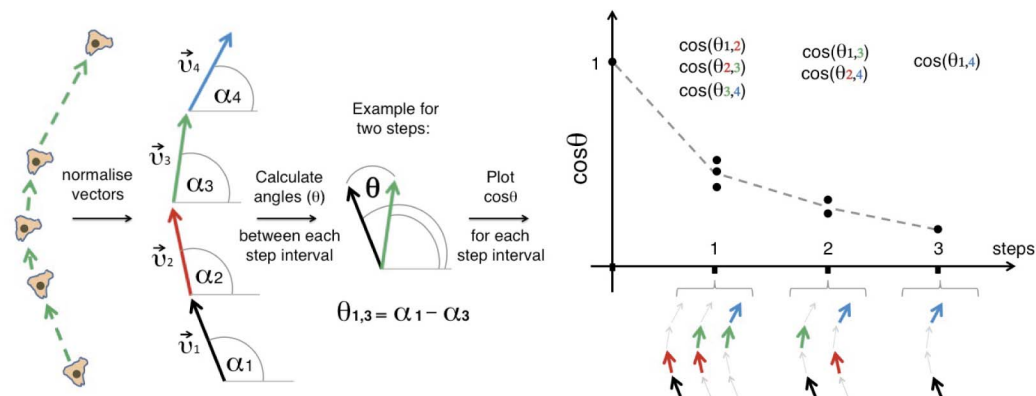
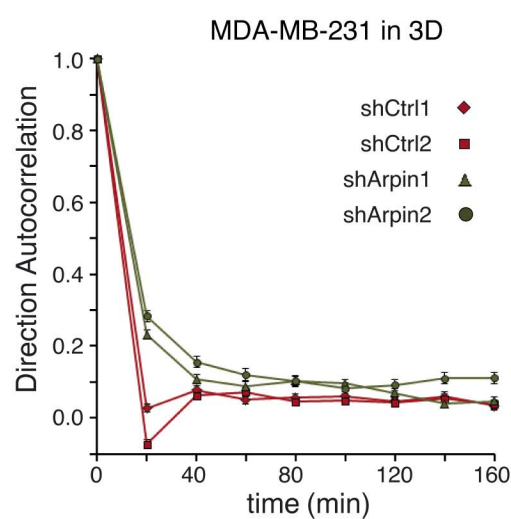
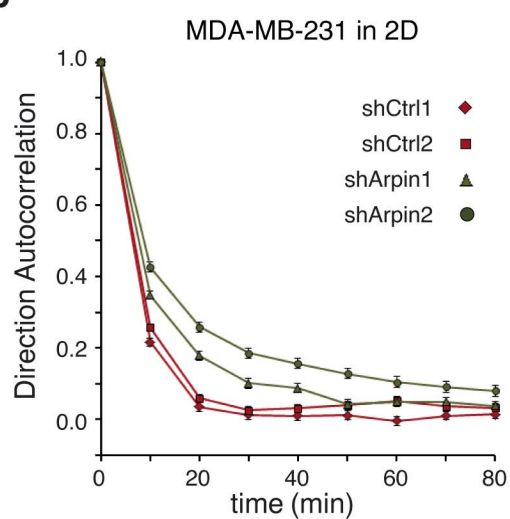
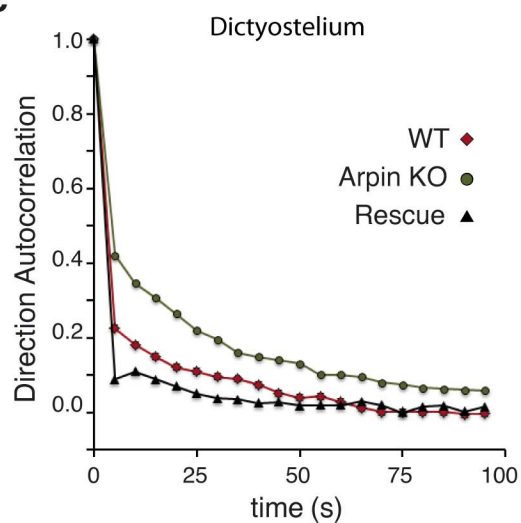
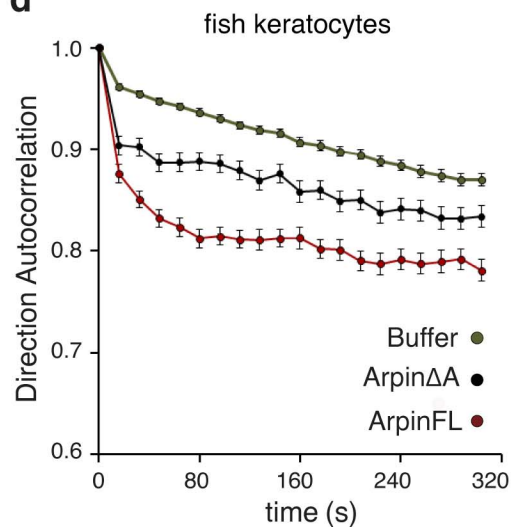
Data Fig. 9). **b**, Cell speed is significantly increased in the Arpin-depleted clones. Mean  $\pm$  s.e.m.;  $n = 27, 25, 26$  and  $17$ , respectively,  $*P < 0.05$ , Kruskal–Wallis, two experiments. Directional persistence, calculated by  $d/D$ , is not significantly different in the clones depleted of Arpin or not. Direction autocorrelation (Extended Data Fig. 10), however, shows an increased directionality in the Arpin-depleted cells at the earliest time points.





**Extended Data Figure 9 | Analysis of mean square displacement of the different migration experiments.** The mean square displacement gives a measure of the area explored by cells for any given time interval. By setting a positional vector on the cellular trajectory at time  $t$ , the MSD is defined as:  $\text{MSD}(\Delta t) = \langle [x(t+t_0) - x(t_0)]^2 + [y(t+t_0) - y(t_0)]^2 \rangle_{t,N}$ , in which brackets  $\langle \rangle$  indicate averages over all starting times  $t_0$  and all cells  $N$ . For each time interval  $\Delta\text{time}$ , mean and s.e.m. are plotted. Error bars corresponding to s.e.m. are plotted, even if too small to be visible. The grey area excludes the noisy part of curves corresponding to large time intervals where less data points are available. **a**, MDA-MB-231 depleted or not of Arpin in a two- or three-dimensional

environment. Arpin-depleted MDA-MB-231 cells explore a larger territory than the controls in time intervals examined (for two dimensions,  $n$  as indicated in Fig. 3a;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA with time and conditions; for three dimensions,  $n$  as indicated in Extended Data Fig. 8;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA with time and conditions). **b**, *Dictyostelium discoideum* knockout amoebae explore a larger territory than controls and rescued amoebae ( $n$  as indicated in Fig. 3b,  $P < 0.001$ , two-way ANOVA with time and conditions). **c**, Arpin-injected fish keratocytes explore a smaller territory than the controls ( $n$  as indicated in Fig. 4b;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA with time and conditions).

**a****b****c****d**



**Extended Data Figure 10 | Analysis of direction autocorrelation of the different migration experiments.** **a**, Principle of the analysis. A hypothetical cell trajectory is depicted. Each step is represented by a vector of normalized length.  $\theta$  is the angle between compared vectors. The plot illustrates the  $\cos\theta$  values for the putative trajectory of four steps (colour-coded). Averaging these  $\cos\theta$  values yields the direction autocorrelation (DA) function of time that measures the extent to which these vectors are aligned over different time intervals. The DA function is defined as:  $DA(t) = \langle v(t_0) \cdot v(t_0 + t) \rangle_{t_0, N} = \langle \cos \theta(t_0, t_0 + t) \rangle_{t_0, N}$ , in which  $v(t_0)$  is the vector at the starting time  $t_0$ , and  $v(t_0 + t)$  the vector at  $t_0 + t$ . Brackets indicate that all calculated cosines are averaged for all possible starting times ( $t_0$ ) over all cells ( $N$ ). For each time interval  $t$ , vectors from all cell trajectories were

used to compute average and sem. Error bars corresponding to s.e.m. are plotted, even if too small to be visible. **b**, Arpin-depleted MDA-MB-231 clones turn less than control cells (for two dimensions,  $n$  as indicated in Fig. 3a;  $P < 0.05$  between 10 and 40 min, Kruskal–Wallis; for three dimensions,  $n$  as indicated in Extended Data Fig. 8;  $P < 0.05$  at time 10 min, Kruskal–Wallis). **c**, Arpin knockout amoebae turn less than wild-type amoebae, and GFP–Arpin overexpressing knockout amoebae (rescue) turn more than wild type ( $n$  as indicated in Fig. 3b;  $P < 0.05$  between 5 and 85 s, Kruskal–Wallis). **e**, Arpin-injected fish keratocytes turn more than buffer-injected cells, and Arpin $\Delta$ A-injected keratocytes turn more than buffer-injected but less than full-length-Arpin-injected keratocytes ( $n$  as indicated in Fig. 4b;  $P < 0.05$  between 16 and 272 s, Kruskal–Wallis).

## II

# Arpin is not essential for chemotaxis

**Dang I<sup>1</sup>**, Linkner J<sup>2</sup>, Yanji J<sup>3</sup>, Irimia D<sup>3</sup>, Faix J<sup>2</sup>, Gautreau A<sup>1</sup>.

**Affiliations:**

<sup>1</sup> group Cytoskeleton in Cell Morphogenesis Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS UPR3082, Gif-sur-Yvette, 91190, France. <sup>2</sup>Institut for Biophysical Chemistry, Hannover Medical School, Hannover 30623, Germany. <sup>3</sup>Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, BioMEMS Resource Center, Boston, MA 02129, United States of America

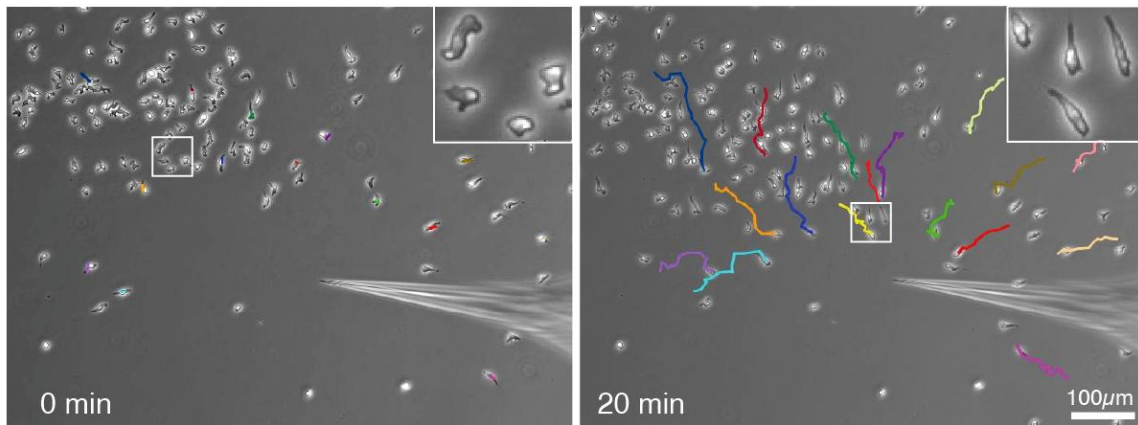
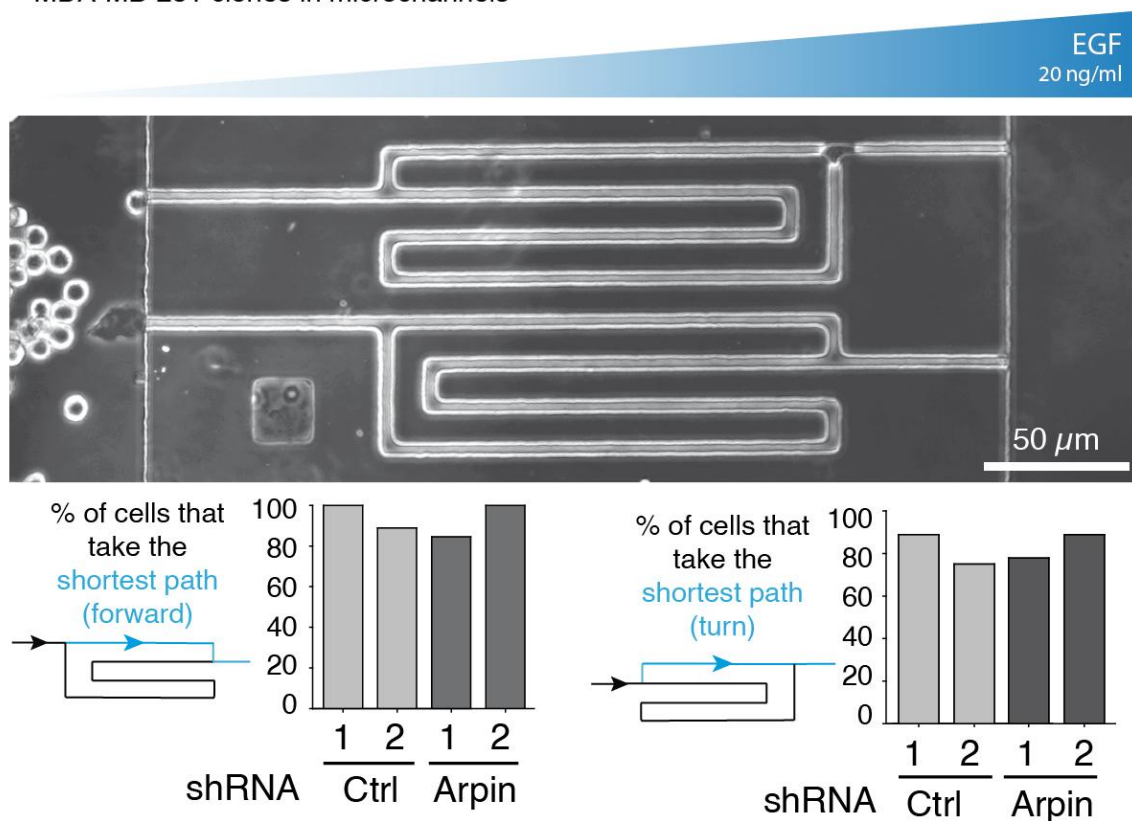
Short correspondence in preparation

Cell migration is triggered by various extracellular cues, such as chemical components, which induces a well-study process called chemotaxis. In response to a stimulus, the cell generates a lamellipodium that pulls the cell body toward the gradient. The lamellipodium is extended by the polymerization of a branched actin networks generated by the Arp2/3 complex. We previously demonstrated that, the Arp2/3 inhibitory protein, Arpin, controls cell migration velocity and directional persistence (Dang et al., 2013). Currently, it is not known whether chemotaxis mechanisms are coupled to cell migration steering. Here, we show that Arpin-depleted cells in two distant species, the Amoeba *Dictyostelium Discoideum* and the human breast tumor cell line MDA-MB-231 do not exhibit obvious chemotaxis defects compared to controls cells. These results indicate that Arpin does not play an essential role in chemotaxis and that Arpin, which primarily controls lamellipodia persistence, is not involved in gradient sensing.

Cell migration is triggered by various extracellular cues, such as chemical components, which induce a well-study process called chemotaxis. Previous model have suggested that in response to solubles factors, the cell generates a new lamellipodium toward the cue. However, this model does not fit with the fast emergence of the lamellipodium occurring in a couple of seconds after the stimulus. A study had recently proposed a computational model to explain more accurately the fast adaptation of the cell in response to the chemoattractant where lamellipodia would be generated randomly around the cell (Neilson et al., 2011). When the chemoattractant is detected, lamellipodium regulation would be modulated to promote directed actin polymerization toward the cue (Neilson et al., 2011). The lamellipodium is extended by the polymerization of branched actin networks generated by the Arp2/3 complex. We previously demonstrated that, the Arp2/3 inhibitory protein, Arpin, controls cell migration velocity and directional persistence (Dang et al., 2013). Currently, it is not known whether chemotaxis mechanisms are coupled to cell migration steering. Two recent papers (Schmick and Bastiaens, 2014; Veltman, 2014), suggest that Arpin, that regulates cell steering, could play a role in the chemotaxis process.

## Results

To study Arpin role in chemotaxis, Arpin gene was knock-out from the well-studied amoeba *Dictyostelium Discoideum*. Arpin-depleted cells behaviors were observed under a gradient of AMPc generates by a micropipette positioned away from the cells. Within a second, Arpin-depleted cells react to the stimulus by getting polarized and starting to migrate toward the gradient efficiently (Figure 1A). Arpin role in chemotaxis was also study in the Arpin-stable depleted clones from the human breast carcinoma cell line, MDA-MB-231, that were previously showed to display an increased cell migration rate and an increase of directionality in 2D and 3D migration assays (Dang et al., 2013). Here, MDA-MB-231 Arpin depleted cells where studied in a system that couple the analysis of the response to the chemoattractant gradient and the ability of the cells to turn toward this gradient. An innovative accurate system of microchannels was used, where the cells have to migrate within smart mazes. Two opposites kind of mazes are used, both containing a longer path and a shorter path. The chemoattractant is added only in one side of the microchannels creating an artificial gradient due to the diffusion of the molecules. According this auto-created gradient, shortest paths are more concentrated in chemoattractants than longer paths. In one kind of maze, cells have to go forward to take the shorter path, whereas, in the other case cells have to turn (Figure 1B). Cells were starved during 5h in serum-free medium and where injected into the center of the device surrounded by the mazes. In the opposite side, the chemoattractant EGF is added. Once chemoattracted-cells enter the microchannels, they are submitted at the first intersection to a dual choice: going straight or take a turn. Most of Arpin-depleted cells take the shortest path rather than the longer path meaning that

**A** Arpin KO Dictyostelium discoideum**B** MDA-MB-231 clones in microchannels

**Figure 1. Arpin depletion does not impaired chemotaxis response.** **A**, Arpin gene was depleted from the amoeba *Dictyostelium Discoideum*. Depleted cells were observed by videomicroscopy during a chemotaxis process where the cells are stimulated by a micropipette-containing AMPc. Arpin depleted cells are able to be polarized and to migrate efficiently toward the AMPc gradient. **B**, The stable Arpin-depleted mammalian cells line, MDA-MB-231 (shArpin 1 and shArpin 2) or control cells (shCtrl 1 and shCtrl 2) were grown in RPMI serum-free medium. After 5h of starvation, cells were injected into the microchannels device where an EGF gradient was artificially generated by adding RPMI containing 1% FBS and 20ng/ml of EGF in the opposite side of the microchannels. To reach the chemoattractant, cells have to migrate within the microchannels and are submitted at the first intersection to two different paths. One corresponds to the shortest path and the second corresponds to the longest path where the chemoattractant gradient is lower. To take the shortest path, cells have to take an angle (upper maze) or to go forward (lower maze). Analyses were done by quantifying the number of cells taking each paths. Arpin-depleted cells and controls cells both mostly take the shortest path where the gradient of EGF is higher (around 80% of the cells). This result indicates that the chemotaxis process is not disrupted in Arpin-depleted cells.

indeed, shortest paths, either forward or with an angle, are more concentrated in chemoattractants than longer paths. Thus, we can deduce from this experiment that Arpin depleted-cells sense the gradient accurately and are indeed able to turn to reach efficiently the chemoattractant. Altogether, these results showed that Arpin-depleted cells, either amoeba or mammalian cells, are able to chemotax efficiently.

## Discussion

Arpin was shown to be a steering factor in cell migration. When Arpin is depleted, cells migrate faster and more directionally due to an increase of lamellipodia persistence (Dang et al., 2013). Chemotaxis is known to be governed by two main properties, polarity and gradient sensing. Both parameters can still take place even in absence of the actin cytoskeleton (Senoo and Iijima, 2013) meaning that chemotaxis and cell migration should work by two distinct pathways that cooperate together to give an appropriate response of the cell. However, it is not known whether cell steering is coupled to gradient sensing or to cell migration. Here, we showed in two different distant species, the amoeba *Dictyostelium Discoideum* and the mammalian cell line MDA-MB-231, derived for a breast tumors, that under chemoattractive gradient conditions, Arpin-depleted are able to polarize and to migrate toward the stimulus without any phenotypic defects. Moreover, Arpin-depleted MDA-MB-231 cells, that are more directionally persistent, are able to make appropriate turns. These results indicates that Arpin do not play a major role in chemotaxis indicating that displaying persistent or more transient lamellipodia do not perturb the ability of the cells to properly migrate toward the stimulus.

Recently, the involvement of the Arp2/3 complex in chemotaxis was discussed following two papers that had concluded opposites results (Suraneni et al., 2012; Wu et al., 2012). One demonstrated that the Arp2/3 complex depletion induces a defect in chemotaxis response. Whereas the second one, showed that even if the Arp2/3 complex is important for cell migration efficiency, it is also not essential for chemotaxis (Wu et al., 2012). More recently JE.Bear's Lab, demonstrates that the defective chemotaxis response observed in R.Li's lab was due to a non autonomous effect of Arp2/3 depletion more than a direct effect (Wu et al., 2013). Our results are clearly in lines with JE. Bear's Lab, where the branched actin networks doesn't seems to be involve in the chemotaxis response. However, *in vivo* chemotatic gradients are more dynamics and variables. In that case, it could be possible that Arpin could play a more subtle role in the dynamic reorganization of actin branched networks *in vivo* in response to changing chemo-attractive environment.

## References

- Dang, I., R. Gorelik, C. Sousa-Blin, E. Derivery, C. Guerin, J. Linkner, M. Nemethova, J.G. Dumortier, F.A. Giger, T.A. Chipysheva, V.D. Ermilova, S. Vacher, V. Campanacci, I. Herrada, A.G. Planson, S. Fetics, V. Henriot, V. David, K. Oguievetskaia, G. Lakisic, F. Pierre, A. Steffen, A. Boyreau, N. Peyrieras, K. Rottner, S. Zinn-Justin, J. Cherfils, I. Bieche, A.Y. Alexandrova, N.B. David, J.V. Small, J. Faix, L. Blanchoin, and A. Gautreau. 2013. Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. *Nature*. 503:281-4.
- Neilson, M.P., D.M. Veltman, P.J. van Haastert, S.D. Webb, J.A. Mackenzie, and R.H. Insall. 2011. Chemotaxis: a feedback-based computational model robustly predicts multiple aspects of real cell behaviour. *PLoS Biol.* 9:e1000618.
- Schmick, M., and P.I. Bastiaens. 2014. The interdependence of membrane shape and cellular signal processing. *Cell*. 156:1132-8.
- Senoo, H., and M. Iijima. 2013. Rho GTPase: A molecular compass for directional cell migration. *Commun Integr Biol.* 6:e27681.
- Suraneni, P., B. Rubinstein, J.R. Unruh, M. Durnin, D. Hanein, and R. Li. 2012. The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J Cell Biol.* 197:239-51.
- Veltman, D. 2014. Actin dynamics: cell migration takes a new turn with arpin. *Curr Biol.* 24:R31-3.
- Wu, C., S.B. Asokan, M.E. Berginski, E.M. Haynes, N.E. Sharpless, J.D. Griffith, S.M. Gomez, and J.E. Bear. 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell*. 148:973-87.
- Wu, C., E.M. Haynes, S.B. Asokan, J.M. Simon, N.E. Sharpless, A.S. Baldwin, I.J. Davis, G.L. Johnson, and J.E. Bear. 2013. Loss of Arp2/3 induces an NF-kappaB-dependent, nonautonomous effect on chemotactic signaling. *J Cell Biol.* 203:907-16.

## III

# Tankyrase interagit avec Arpin

Récemment, nous avons découvert Arpin, une nouvelle protéine qui inhibe le complexe Arp2/3 au lamellipode et contrôle la direction de migration (Dang et al., 2013). Au niveau moléculaire nous avons montré qu'Arpin était activée par la petite GTPase Rac et ce, de manière indirecte. Par différentes techniques, nous avons identifié Tankyrase comme protéine interagissant avec Arpin et dont l'interaction ne semble pas dépendre de la petite GTPase Rac. Tankyrase catalyse des réactions de Poly-ADP-ribosylation sur la plupart des protéines avec lesquelles elle interagit. Ces modifications ont pour conséquences d'entraîner les substrats de Tankyrase vers le protéasome pour être dégradés. Toutefois, Tankyrase n'exerce aucune activité catalytique sur Arpin. De façon intéressante, le motif d'interaction d'Arpin qui permet son interaction avec Tankyrase se superpose à la séquence acide nécessaire pour l'interaction avec le complexe Arp2/3. Ceci a permis d'identifier *in vitro* une compétition entre Tankyrase et le complexe Arp2/3 sur Arpin, et suggère que Tankyrase inhibe Arpin.

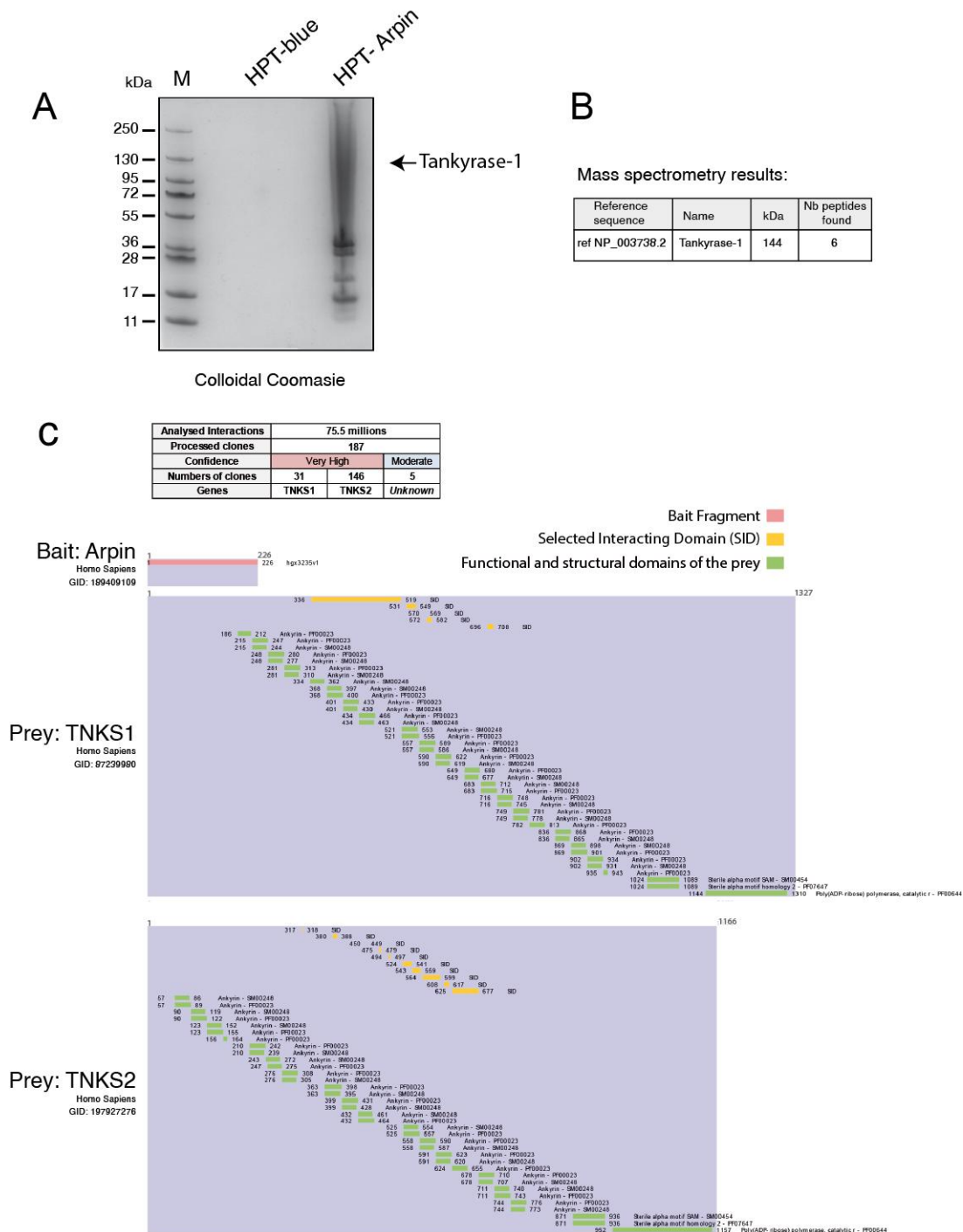
D'autre part, nous avons montré que l'expression d'Arpin et Tankyrase dépend l'une de l'autre dans les lignées cellulaires. Au contraire, la corrélation est perdue et a tendance à s'inverser dans les lignées de cellules invasives. Ces observations suggèrent un mécanisme de régulation complexe des niveaux de régulation d'Arpin et de Tankyrase qui s'établit probablement au cours des processus d'invasivité. Des études de l'activité inhibitrice d'Arpin sur le complexe Arp2/3 dans ces différentes lignées cellulaires seront à réaliser pour comprendre la régulation d'Arpin par Tankyrase et il serait intéressant d'observer les conséquences des niveaux d'expressions de chaque protéine sur le phénotype des cellules.

## 1. Identification d'un interacteur d'Arpin: Tankyrase

Arpin est une nouvelle protéine identifiée comme inhibitrice du complexe Arp2/3 au lamellipode (Dang et al., 2013). Nous avons montré qu'Arpin était activée par la petite GTPase Rac et ce, de manière indirecte. Afin de déterminer la façon dont Arpin est régulée par cette voie, nous avons cherché des intermédiaires protéiques potentiels entre Rac et Arpin en identifiant les protéines interagissant directement avec Arpin.

Nous avons cherché à identifier toutes les protéines capables d'interagir avec Arpin par la technique du «TAP tag» (Tandem Affinity Purification). Dans cette expérience, Arpin est produite de façon stable par des cellules de mammifères 293T et possède un tag His-PC-Tev (HPT) en N-terminal. Après le pull-down d'Arpin dans les extraits de cellules, toutes les protéines liées à Arpin ont été analysées (Figure 1A). Les résultats de la spectrométrie de masse ont permis d'identifier une seule protéine interagissant avec Arpin : Tankyrase (Figure 1B). L'interaction d'Arpin avec les sous-unités du complexe Arp2/3 n'est pas détectée en raison du caractère très transitoire et conditions spécifiques de l'interaction. En parallèle, l'interaction directe Arpin-Tankyrase a été confirmée par la technique du double hybride (Hybrigenics) avec Arpin comme appât. Les seules proies détectées par cette technique correspondent aux deux paralogues de Tankyrase, TNKS1 et TNKS2 (Figure 1C). De plus, cette technique révèle qu'Arpin interagit avec TNKS1 et TNKS2 sur leurs domaines ANK (« Ankyrin repeat », voir partie 2)





**Figure 1. Identification de Tankyrase comme protéine interagissant avec Arpin.** **A**, Des extraits de cellules 293T exprimant de manière stable HPT-Arpin ou le contrôle HPT-blue ont été incubés sur une colonne de billes couplées à des anticorps PC. Les billes ont ensuite été déposées sur gel d'acrylamide 4-12%. Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie Colloïdal. Les résultats montrent la présence de plusieurs bandes indiquant qu'Arpin semble interagir avec d'autres protéines. **B**, La spectrométrie de masse, réalisée à partir des bandes découpées sur le gel d'acrylamide indiquent qu'Arpin n'interagit qu'avec une seule protéine, Tankyrase-1. Le reste est probablement dû à de la dégradation et éventuellement à des conjugués de hauts poids moléculaires. **C**, Expérience de double hybride réalisée avec Arpin comme appât. Les interactions ont été criblées sur plus de 75 millions de proies dont 187 positives ont été analysées. Le fragment rose correspond à la séquence des 226aa d'Arpin, utilisée comme appât et a permis l'identification de deux proies TNKS1 et TNKS1. Les fragments jaunes correspondent aux domaines d'interactions détectés entre l'appât et chaque proie. Les fragments verts correspondent aux domaines structuraux des proies. Arpin interagit avec TNKS1 et TNKS1 sur les domaines ANK.

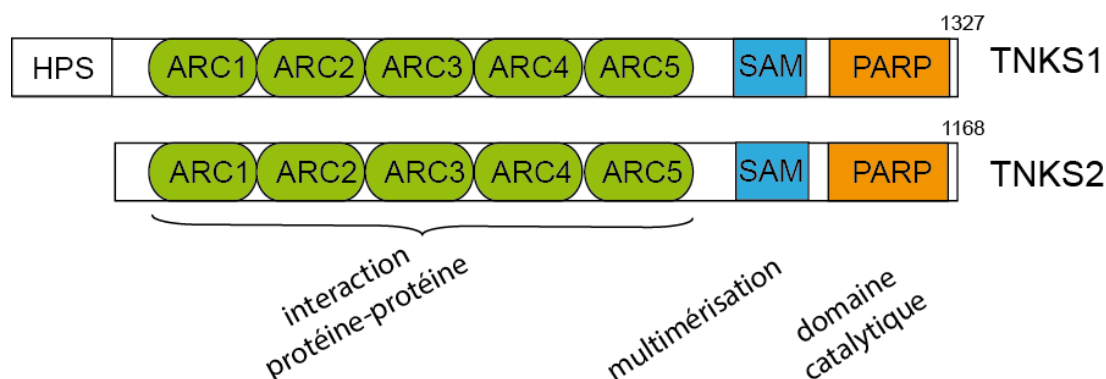
## 2. Les Tankyrases sont des ADP-ribosyltransférases

### 2.1. Caractéristiques fonctionnelles et structurales des Tankyrases

Les Tankyrases constituent une famille de protéines ubiquitairement exprimées. TNKS1 a été originellement identifiée comme une protéine se liant à TRF1 d'où son nom *TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase I* (Smith et al., 1998). Tankyrase fait partie des ADP-ribosyltransférases (ARTDs : EC.2.4.2.30) et en particulier de la classe des Poly-ADP-Ribosyl Polymerase (« PARP ») qui sont capable de transférer de façon covalente plusieurs résidus d'ADP-riboses sur leur substrat à partir de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. Cette modification post-traductionnelle appelée Poly-ADP-ribosylation, peut avoir de nombreuses conséquences sur le substrat. Elle peut entraîner des modifications d'affinités entre le substrat et un de ses partenaires ou à l'inverse, favoriser le recrutement de partenaires sur le substrat. Elle peut aussi affecter la stabilité du substrat dans la cellule en les dirigeants vers le protéasome.

Les 18 membres de la superfamille des PARP possèdent tous en commun le domaine catalytique. Effectivement, Tankyrase possède ce domaine PARP mais il diffère des autres membres de la famille par la présence d'un domaine SAM (« Sterile Motif Alpha ») permettant sa multimérisation et de domaines ANK (« ankyrin repeat ») (Figure 2). Les domaines ANK, constitués au total de 24 répétitions d'ankyrines, sont regroupés en 5 sous-domaines bien conservés appelés ARCs (« ankyrin repeat clusters »). Ces derniers sont responsables des interactions protéines-protéines. Il existe deux paralogues de Tankyrase, Tankyrase-1 (TNKS1, 142kDa) et Tankyrase-2 (TNKS2, 126 kDa). Elles diffèrent l'une de l'autre par le nombre d'ANK et un domaine HPS (histidine-proline-sérine) supplémentaire en N-terminal sur TNKS1 mais dont la fonction reste inconnue à ce jour (Figure 2). Par la suite nous parlerons de Tankyrase indistinctement des deux isoformes puisque nous avons montré qu'Arpin interagit avec TNKS1 et TNKS2 (Figure1C).

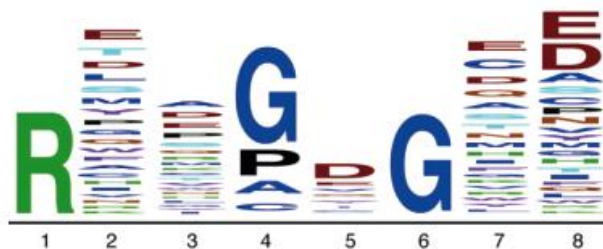
Dans la cellule, Tankyrase, peut s'auto-réguler grâce à son domaine SAM, qui lui permet de multimériser et de s'auto-Poly-ADP-ribosyler, déclenchant un signal de reconnaissance pour l'ubiquitination. La Poly-ADP-ribosylation est reconnu par le domaine WWE de l'« E3 ubiquitin ligase RING finger protein 146 » (RNF146) qui adresse alors la protéine au protéasome (Callow et al., 2011; Zhang et al., 2011).



**Figure 2. Structure des deux paralogues de Tankyrase.** Les deux paralogues de Tankyrases, TNKS1 et TNKS2 possèdent en commun le domaine catalytique PARP (« Poly-ADP-Ribosyl Polymerase »), le domaine de multimérisation SAM (« Sterile Motif Alpha ») et 5 sous-domaines ARCs (« Ankyrin Repeat Clusters ») qui leur permettent les interactions protéine-protéine. TNKS1 possède un domaine HPS en N-terminal dont la fonction n'est pas connue.

## 2.2. Les protéines interagissant avec Tankyrase

Diverses protéines sont capables d'interagir avec Tankyrase (Guettler et al., 2011). L'étude de l'interaction entre le domaine ARC4 de TNKS2 et différents peptides issus d'une bibliothèque de peptides a permis de déterminer le motif consensus permettant aux protéines de se lier à la poche concave formée par les domaines ARCs de Tankyrase (Guettler et al., 2011). Cette séquence est constituée de huit acides aminés RXXPXGXX, dans laquelle les résidus clés sont l'arginine en position 1, la glycine en position 6 ainsi qu'un acide aminé hydrophobe en position 4 (Guettler et al., 2011; Morrone et al., 2012) (Figure 3). D'après ce motif consensus, une centaine de candidats ont été prédits mais seulement 17 ont été validés expérimentalement (Guettler et al., 2011; Sbodio and Chi, 2002; Seimiya et al., 2004).



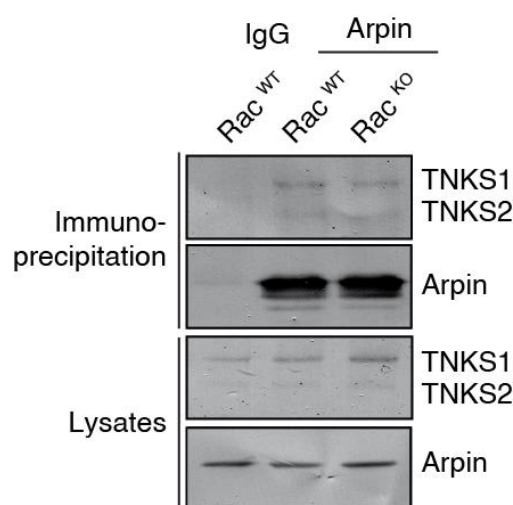
**Figure 3. Motif consensus d'interaction avec Tankyrase.** Toutes les protéines interagissant avec Tankyrases contiennent un motif d'interaction de huit acides aminés (RXXPXGXX). Parmi ces résidus, trois sont ultra-conservés : l'arginine (R) en position 1, la glycine (G) en position 6, et un acide aminé hydrophobe en position 4. Extrait de (Guettler et al., 2011)

### 3. Caractérisation de l'interaction entre Arpin et Tankyrase

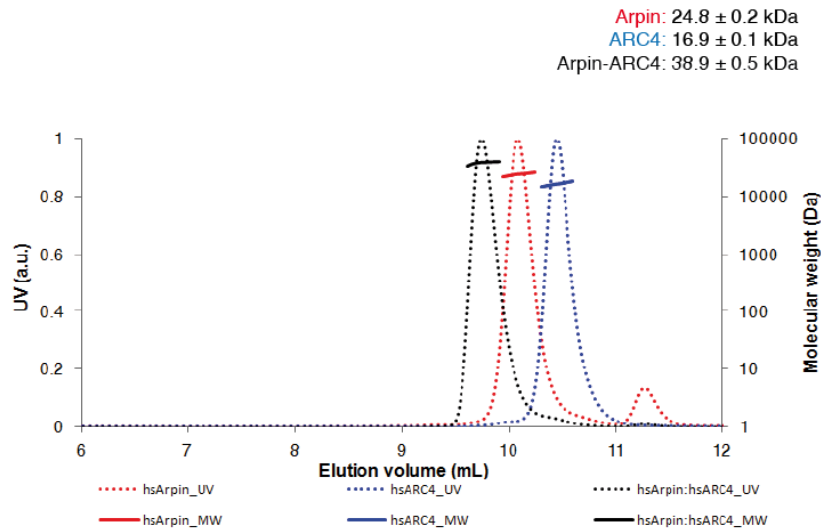
#### 3.1. Validation de l'interaction Arpin-Tankyrase

Afin de valider l'interaction endogène entre Arpin et Tankyrase, une co-immunoprécipitation endogène d'Arpin a été réalisée dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Effectivement, l'interaction Arpin-Tankyrase est bien détectée dans les cellules MEF sauvages (Figure 4). La même expérience a été réalisée en parallèle à partir d'extraits de cellules MEF dans lesquelles le gène de Rac1 a été délété (Steffen et al., 2013). Même en absence de Rac, l'interaction Arpin-Tankyrase a lieu ce qui montre qu'elle est indépendante de la voie Rac (Figure 4).

Pour valider que l'interaction Arpin-Tankyrase est directe, Arpin et le domaine d'interaction de Tankyrase le mieux caractérisé, ARC4 ont été pré-incubé et analysé par chromatographie d'exclusion couplée à un détecteur de diffusion de lumière multi-angle (SEC-MALS) qui permet de déterminer la masse moléculaire d'assemblage de protéines en solution. Les résultats montrent qu'en effet l'interaction des deux protéines est directe avec un ratio 1 :1 (Figure 5).



**Figure 4. Co-immunoprécipitation endogène de Tankyrase non dépendante de Rac.** La protéine Arpin a été co-immunoprécipitée à partir d'extraits cellulaires de cellules embryonnaires de souris immortalisées (MEF) sauvages ou dans lesquelles le gène de Rac1 a été délété. Les protéines liées aux billes ont été lavées, déposées sur gel d'acrylamide 4-12% et TNKS 1 et 2 ont été analysé par immuno-blot. Arpin interagit avec TNKS même en absence de Rac.

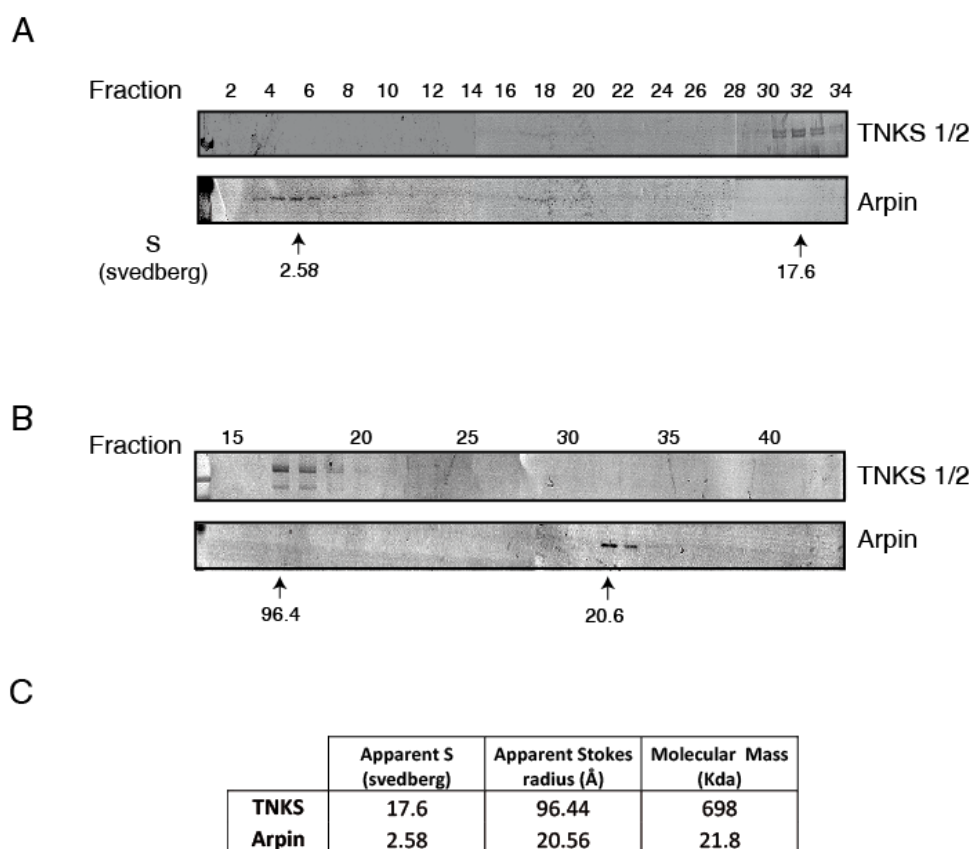


**Figure 5. Arpin interagit directement avec Tankyrase.** Analyse de l'interaction entre la protéine humaine Arpin et le domaine ARC4. Les deux peptides ont été pré-incubés puis analysés par SEC-MALS. De manière cohérente, on obtient trois pics d'élutions: deux appartenant chacun respectivement à ARC4 (16,9kDa) et Arpin (24,8kDa) et le dernier correspondant au complexe Arpin-ARC4 de 38,9 kDa.

### 3.2. Arpin et Tankyrase ne forment pas un complexe stable

Dans le but d'étudier la stabilité de l'interaction entre Arpin et Tankyrase dans la cellule, les extraits de cellules murines 3T3 fractionnés soit en gradient de sucrose, soit en chromatographie d'exclusion de tailles (SEC) de, (Derivery et al., 2009a) ont été analysés par immuno-blot. La co-élution de protéines obtenues par ce type d'expérience a permis notamment de démontrer l'existence de complexes stables tels que le complexe WAVE (Gautreau et al., 2004), ou encore le complexe WASH (Derivery et al., 2009a).

Dans le cas d'Arpin et de Tankyrase, les résultats montrent cependant que les deux protéines ne co-éluent pas (Figure 6A et B). La calibration du volume d'élution grâce à l'utilisation de protéines marqueurs, de poids moléculaires connus, permet de déterminer pour chaque protéine le coefficient de sédimentation (Svedberg) par la purification en gradient de sucrose et le rayon de Stokes par le SEC. Ensemble, ces deux paramètres permettent de déterminer la masse moléculaire apparente d'Arpin et de Tankyrase et d'en déduire la stœchiométrie des molécules (Figure 5C). Par cette formule, la masse moléculaire apparente obtenue pour Arpin est de 21.8 kDa. Arpin, protéine de 25 kDa est donc une protéine monomérique et ne s'associe de façon stable à aucune protéine. Tankyrase a une masse moléculaire apparente d'environ 700 kDa ce qui indique que Tankyrase serait associé en un polymère stable dans la cellule, de manière cohérente avec son domaine SAM qui lui permet de se multimériser. En conclusion, ces résultats montrent que l'interaction entre Arpin et Tankyrase n'est pas stable mais se ferait plutôt de façon transitoire.

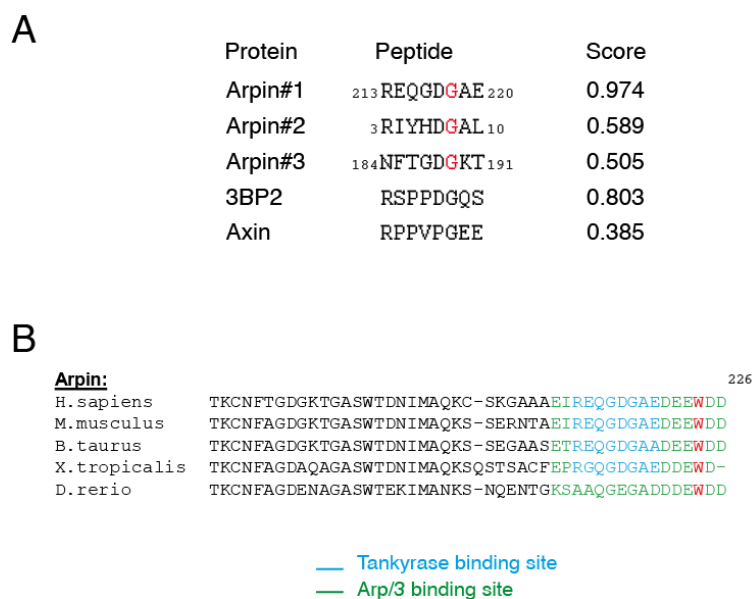


**Figure 6. Caractérisation d'Arpin et Tankyrase dans les extraits fractionnés** **A**, Des extraits de cellules 3T3 ont été fractionnés en gradient de sucrose et les fractions ont été analysées par Western Blot pour détecter Arpin et Tankyrase. Arpin est éluée à la fraction 5 correspondant à 2.58 Svedberg. Tankyrase est éluée à la fraction 32 correspondant à 17.6 Svedberg. **B**, Des extraits de cellules 3T3 ont été fractionnés par chromatographie d'exclusion de taille et les fractions ont été analysées par Western Blot pour détecter Arpin et Tankyrase. Arpin est élué à la fraction 32 correspondant à 20.6 Å. Tankyrase est élué à la fraction 17 correspondant à 96.4 Å. **C**, La masse moléculaire théorique de chaque protéine est déterminée à partir du coefficient de sédimentation (Svedberg) et du rayon de Stokes obtenus expérimentalement en utilisant l'équation de Siegel et Monty (Siegel and Monty, 1966).  $M = \frac{6\pi\eta NaS}{(1-\nu\rho)}$  où M est la masse moléculaire en Da ( $\text{g.mol}^{-1}$ );  $\eta$  est la viscosité du milieu,  $1.002 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ; N est le nombre d'Avogadro,  $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ; a est le rayon de Stokes ( $\text{\AA}$ , i.e.  $10^{-8} \text{ cm}$ ); S est le coefficient de sédimentation (S en Svedberg,  $10^{-13} \text{ s}$ );  $\nu$  est le volume spécifique partiel,  $0.725 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $\rho$  est la densité du milieu,  $0.998 \text{ g cm}^{-3}$ .

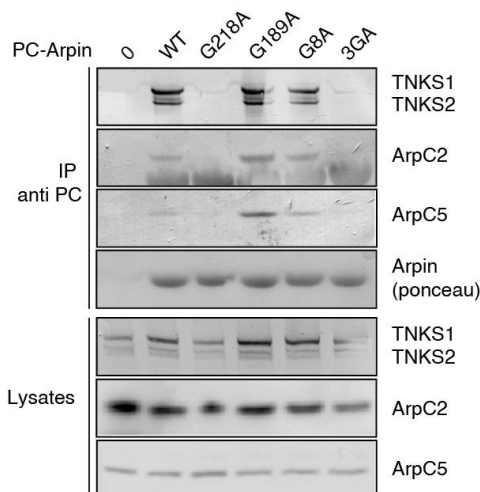
### 3.3. Identification d'une mutation d'Arpin qui abolit l'interaction avec Tankyrase

Toutes les protéines interagissant avec Tankyrase possèdent un motif consensus d'interaction. Dans le but de détecter la présence de ce motif d'interaction dans la séquence d'Arpin, nous nous sommes basés sur les résultats du crible bio-informatique réalisé dans l'article qui a identifié ce motif consensus (Guettler et al., 2011). De façon surprenante, trois séquences peptidiques appartenant à Arpin ont été détectées avec un score plus ou moins élevé. On remarque qu'une des séquences est classée avant même 3BP2 ou Axin, deux interacteurs de Tankyrase très bien caractérisés (Figure 7A). Si l'on s'intéresse à la séquence la mieux classée d'Arpin, on remarque qu'elle est conservée de façon ubiquitaire, exceptée chez le zebrafish *D.rerio*. De plus elle se situe dans le motif acide (A) en C-terminal d'Arpin, permettant l'interaction avec le complexe Arp2/3 (Figure 7B). On peut donc s'attendre à une compétition entre le complexe Arp2/3 et Tankyrase.

Afin de déterminer le ou les résidus critiques à l'interaction Arpin-Tankyrase, un mutant d'Arpin a été construit pour chacun des trois peptides putatifs dans lequel le résidu essentiel glycine en position 6 (RXXPXGXX) a été remplacé par une alanine (G218A, G189A, G8A ou le triple mutant 3GA). En effet le résidu glycine est critique et conservé chez toutes les protéines interagissant avec Tankyrase. Des cellules 293T ont ensuite été transfectées soit avec l'Arpin sauvage, soit avec chacun des mutants soit avec le mutant contenant les trois mutations. La co-immunoprécipitation d'Arpin dans ces cellules via l'étiquette PC permet dans un premier temps de valider l'interaction d'Arpin avec TNKS1 et TNKS2 dans la cellule. Les résultats montrent que seule la glycine sur le peptide#1 d'Arpin est indispensable et requise pour l'interaction Arpin-Tankyrase (Figure 8). Malheureusement la mutation G218A introduite affecte aussi l'interaction entre Arpin et le complexe Arp2/3 (observation par anisotropie de fluorescence, non montrée, par Laurent Blanchoin, CEA, Grenoble). Cette mutation ne permet donc pas de découpler l'interaction avec Tankyrase de l'interaction avec le complexe Arp2/3.



**Figure 7. Arpin contient plusieurs séquences susceptibles d'interagir Tankyrase.** **A**, Le crible bio-informatique réalisé par (Guettler et al., 2011) basé sur le motif consensus RXXPXGXX a permis d'identifier trois peptides appartenant à la séquence d'Arpin à score particulièrement élevé par rapport à deux substrats bien caractérisés de Tankyrase 3BP2 (Guettler et al., 2011) et Axin (Huang et al., 2009). **B**, La séquence consensus d'Arpin à plus haut score d'interaction avec Tankyrase (Arpin#1) est localisée à l'extrémité C-terminal d'Arpin. Cette séquence se superpose à la séquence acide d'interaction avec le complexe Arp2/3 suggérant une compétition entre les deux sites.

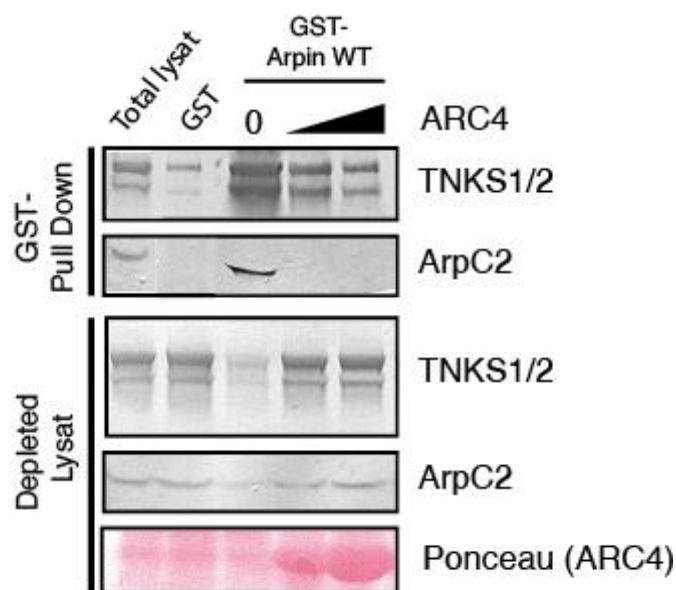


**Figure 8. La séquence d'interaction Arpin#1 est celle qui interagit avec Tankyrase.** Les cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide contrôle, avec un plasmide codant pour PC-Arpin sauvage (WT), PC-Arpin mutant (G218A, G189A, G8A ou le triple mutant 3GA). Après deux jours d'incubation, les cellules ont été lysées et les extraits ont été incubés avec des billes liées aux anticorps PC, lavées et déposées sur gel d'acrylamide 4-12%. Par immunoblot, on voit que l'interaction avec TNKS1/2 est perdue seulement lorsque le résidu G218 est muté en A et par conséquent dans le triple mutant.



### 3.4. Compétition entre Tankyrase et le complexe Arp2/3 sur la queue acide d'Arpin

En sachant que la séquence d'interaction avec Tankyrase est située dans la queue acide d'Arpin, permettant l'interaction avec le complexe Arp2/3, nous avons voulu voir, si Tankyrase et le complexe Arp2/3 étaient en compétition l'un et l'autre sur Arpin. La protéine de fusion GST-Arpin humaine a été produite et purifiée, puis a été fixée sur des billes de glutathions. Ces billes ont été incubées avec des extraits de cellules MEFs en présence de quantités croissantes d'ARC4. Les billes, après lavages et les lysats déplétés ont ensuite été analysé par Western blot. Dès l'ajout d'ARC4 dans les lysats, l'interaction d'Arpin avec Arp2/3 est déplacée et le complexe Arp2/3 n'est plus déplété dans les lysats. Ces résultats indiquent qu'effectivement, Arp2/3 et Tankyrase sont en compétition pour interagir avec Arpin (Figure 9).

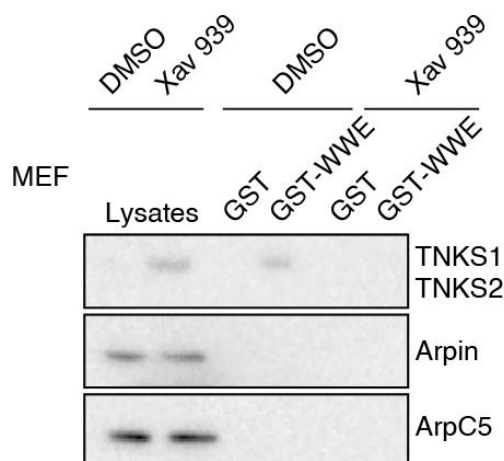


**Figure 9. Le complexe Arp2/3 et Tankyrase sont en compétition pour interagir avec Arpin.** Des extraits de cellules MEFs ont été incubé en présence d'une quantité constante de billes de glutathions couplées à GST-Arpin ou au contrôle GST et d'une quantité croissante d'ARC4 purifié. Les billes ont ensuite été lavées et déposées sur gel d'acrylamide 4-12% puis immunoblottées pour TNKS1/2 et ArpC2, une sous unité du complexe Arp2/3. En absence d'ARC4 exogène, Arpin interagit avec le complexe Arp2/3 et avec Tankyrase (GST pull-down), qui sont dépletés dans le lysat (depleted lysat). Dès l'addition d'ARC4, l'interaction avec ArpC2 est complètement abolie. On note aussi une diminution de l'interaction avec TNKS1/2 endogène.

## 4. Influence de l'activité catalytique de Tankyrase

### 4.1. Arpin n'est pas un substrat de Tankyrase

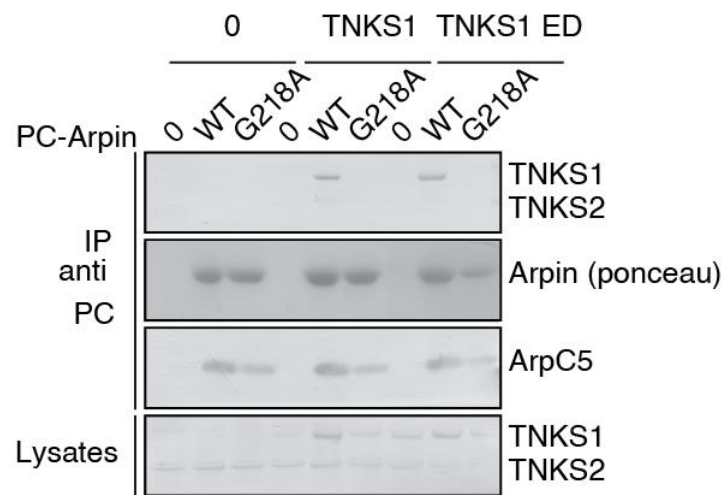
Tankyrase est une PARP et poly-ADP-ribosyle la plupart des protéines avec lesquelles elle interagit. Dans le but de déterminer si Arpin était également modifié par Tankyrase, le domaine WWE de l'ubiquitine ligase RNF146 a été couplé à la GST, produit et purifié. En effet, ce domaine interagit spécifiquement avec les protéines ADP-ribosylées. Les GST pull-down ont été réalisés sur des extraits de cellules MEFs. En contrôle, l'inhibiteur chimique de l'activité de Tankyrase, XAV939, est utilisé en parallèle pour valider que la protéine détectée est Poly-ADP-ribosylée spécifiquement par Tankyrase. L'effet de cet inhibiteur est confirmé par le fait que le niveau de Tankyrase augmente dans les lysats : Tankyrase ne peut plus s'auto-Poly-ADP-ribosyler et n'est plus dégradée par le protéasome (résultats non montrés). Les résultats indiquent, comme attendu, que Tankyrase est bien auto- Poly-ADP-ribosylée cependant, ni Arpin, ni Arp2/3 ne le sont (Figure 10).



**Figure 10. Arpin n'est pas Poly-ADP-ribosylée par TNKS.** Les cellules embryonnaires de souris (MEF) ont été traitées (Xav939) ou non (DMSO) avec l'inhibiteur de l'activité PARP de TNKS, Xav939. Après 16h de traitement, les cellules ont été lysées et les extraits ont été incubés avec les protéines purifiées GST-WWE ou le contrôle GST seul, liées à des billes de glutathions. Les protéines liées aux billes ont ensuite été lavées, déposées sur gel d'acrylamide puis analysées par Western-Blot. L'efficacité du traitement avec Xav939 est validée par le fait que le niveau de TNKS augmente dans les lysats. Dans les cellules non-traitées (DMSO), seule TNKS interagit avec le domaine WWE ce qui indique que ni Arpin, ni la sous-unité du complexe Arp2/3 (ArpC5) ne sont poly-ADP-ribosylées. Dans les cellules traitées (Xav939) l'interaction entre GST-WWE et TNKS n'est plus détectée ce qui confirme que TNKS est bien auto-poly-ADP-ribosylée.

## 4.2. L'activité catalytique de Tankyrase n'est pas requise pour interagir avec Arpin

Malgré l'absence de modification d'Arpin par TNKS, il est tout de même intéressant de savoir si cette activité catalytique est requise pour l'interaction entre les deux protéines. Un mutant catalytiquement, inactif de TNKS1 (TNKS1 ED) a été construit et a été co-transfecté avec PC-Arpin sauvage (WT) ou avec le mutant Arpin G218A dans les cellules 293T. Après immunoprécipitation, les résultats d'immuno-blot montrent que l'interaction Arpin-Tankyrase lieu de façon indépendante à l'activité catalytique de Tankyrase (Figure 11). Ces résultats montrent que l'interaction de Tankyrase sur Arpin semble jouer un autre rôle que la régulation du niveau d'expression d'Arpin contrairement à la plupart des autres substrats connus qui sont dégradés par le protéasome après poly-ADP-ribosylation.

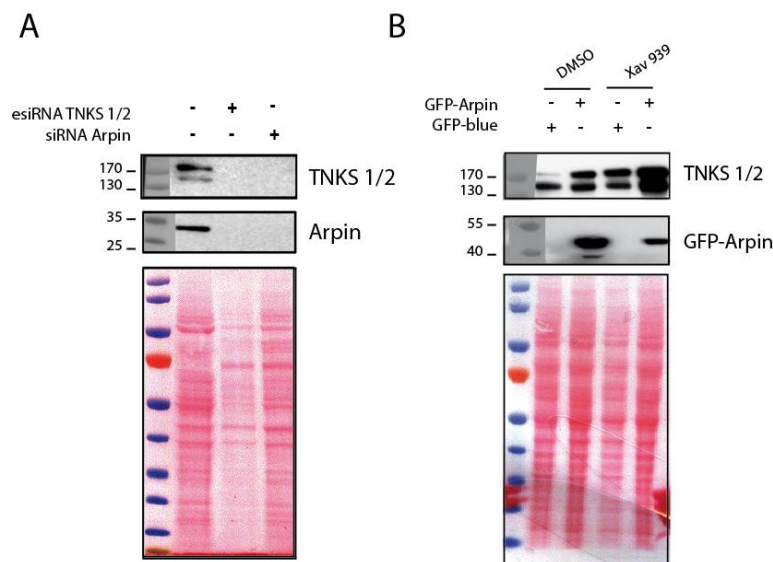


**Figure 11. L'activité catalytique de TNKS n'est pas requise pour l'interaction avec Arpin.** Des cellules de souris 293T ont été co-transfectées avec PC-Arpin sauvage (WT), PC-Arpin mutant (G218A) ou un plasmide PC contrôle (0) avec TNKS1 ou TNKS1 catalytiquement inactif (TNKS1 ED). Après 48h de transfections, les cellules ont été lysées puis les extraits ont été incubés avec des billes liées à des anticorps anti-PC. Après 3h d'incubations, les billes ont été immuno-précipitées, lavées et déposées sur gel d'acrylamide puis analysées par Western-Blot. Les résultats montrent qu'Arpin interagit avec TNKS1 de façon indépendante à son activité catalytique PARP.

## 5. Corrélation des niveaux d'expression d'Arpin et Tankyrase

### 5.1. Le niveau d'expression d'Arpin et Tankyrase dépend l'un de l'autre dans les lignées cellulaires

Afin d'étudier l'importance de l'interaction entre Arpin et Tankyrase, chacune des protéines a été déplétée par ARN interférences dans des cellules de mammifères. De manière surprenante, la déplétion de l'une ou l'autre des protéines entraîne mutuellement la perte d'expression de l'autre dans les cellules hTERT-RPE1 (lignée de cellules immortalisées « Retinal pigment epithelial ») (Figure 12A). Au contraire, la surexpression d'Arpin dans la lignée 293T, entraîne la stabilisation de Tankyrase, de manière similaire à ce qui est observé avec le traitement par l'inhibiteur, Xav939 (Figure 12B). Enfin la combinaison de la surexpression d'Arpin et le traitement au Xav939 maintient un niveau encore plus élevé de Tankyrase ce qui suggère que l'augmentation du niveau de Tankyrase par Arpin n'est donc pas due à une inhibition de l'activité PARP de Tankyrase. En résumé, ces résultats suggèrent que le niveau d'expression des protéines Arpin et Tankyrase dépend l'une de l'autre et qu'Arpin stabilise le niveau de Tankyrase.



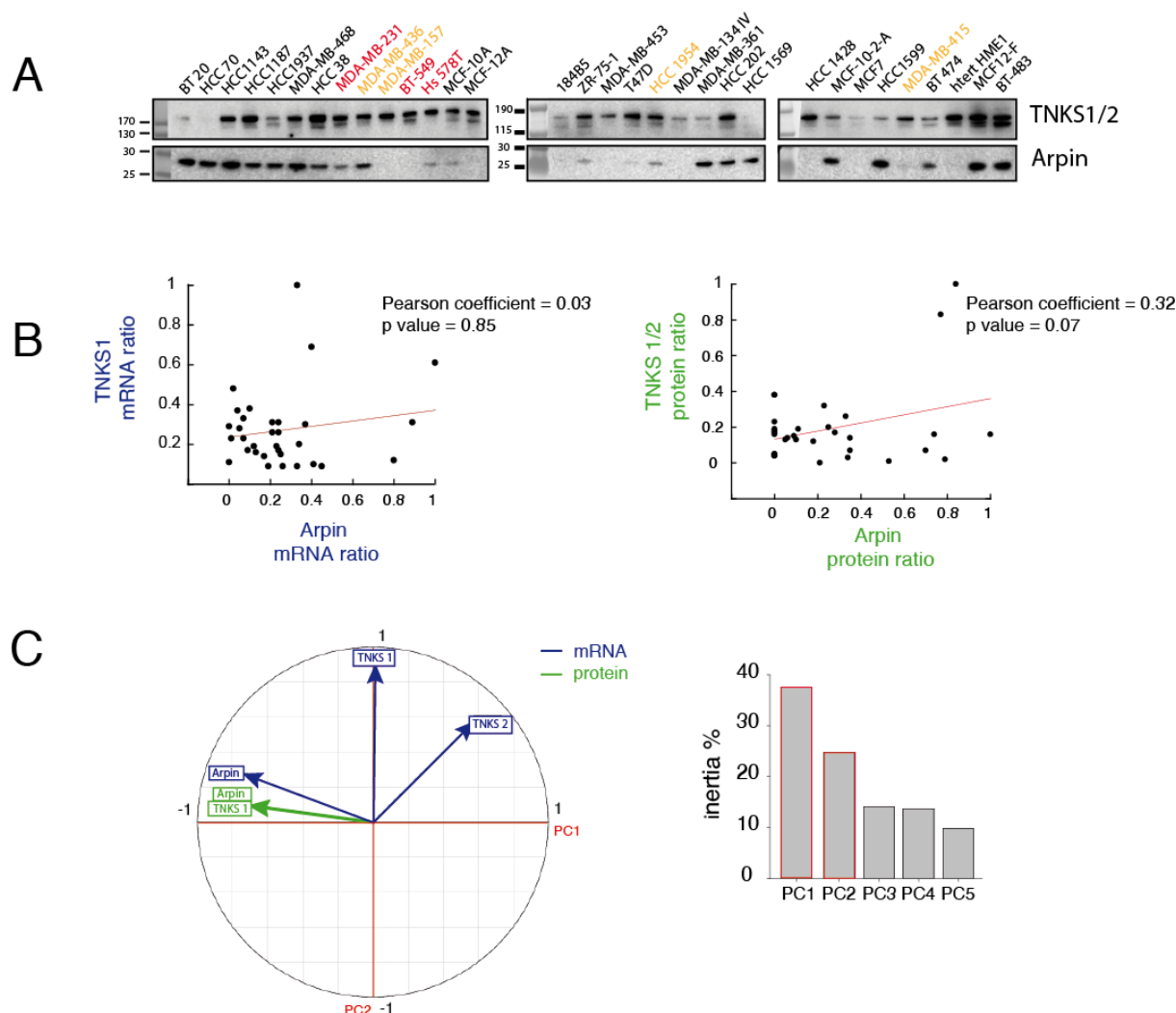
**Figure 12. Le niveau protéique d'Arpin et TNKS co-varient dans les lignées cellulaires.** **A**, Les cellules de mammifères hTERT-RPE-1 ont été déplétées soit de TNKS1/2 soit d'Arpin par ARN interférents pendant 72h et les extraits cellulaires ont été analysés par Western Blot. La déplétion de l'une des protéines, TNKS ou Arpin entraîne la déplétion de l'autre. **B**, Arpin stabilise le niveau de TNKS. Les cellules 293T ont été traitées ou non avec l'inhibiteur de TNKS, Xav939 et transfectées avec GFP-Arpin ou le contrôle GFP-Blue par le phosphate de calcium. La surexpression d'Arpin augmente le niveau de TNKS endogène. Lorsque les cellules qui surexpriment Arpin sont traitées avec Xav939, le niveau de TNKS est d'autant plus augmenté.

## 5.2. Niveau d'expression d'Arpin et Tankyrase dans lignées tumorales

Des études préliminaires réalisées par nos collaborateurs ont montré que les niveaux d'expression d'Arpin au niveau protéique (Antonina Alexandrova, Blokhin Cancer Center, Moscou) et ARN messagers (Ivan Bièche, Institut Curie) étaient sous-exprimés plus les tumeurs mammaires étaient invasives et cette sous-expression est corrélée à une survie réduite des patientes. Ces résultats (non montrés ici) ont été brevetés (Brevet Européen n°13306198.6, du 03/09/2013).

Afin de déterminer s'il y avait une corrélation possible entre les niveaux d'Arpin et de Tankyrase dans les tumeurs nous avons analysé par western blot l'expression de ces deux protéines, Arpin et Tankyrase, dans une trentaine de lignées de cellules mammaires, tumorales ou non (Figure 13A). Au niveau protéique, une faible corrélation est détectable entre Arpin et Tankyrase (Figure 13B). Des analyses par RT-qPCR ont également été réalisées (Ivan Bièche, Institut Curie) dans ces mêmes lignées. Au niveau des ARN messagers, Arpin et Tankyrase ne corrèlent pas non plus (Figure 13B). Afin d'augmenter les différences et de mieux visualiser les effets, toutes les données d'expressions protéiques et d'ARN messagers ont été combinées et ont été analysées par ACP (analyse par composante principale, Figure 13C). Cette analyse permet de placer l'ensemble des données sur les deux axes qui expliquent le mieux les effets. Les axes obtenus par ces analyses, expliquent 40% des effets biologiques observés. Les tendances obtenues avec les courbes de corrélations sont confirmées. Les niveaux d'ARN messagers d'Arpin et Tankyrase sont sur un axe perpendiculaire voir opposé ce qui indique que le niveau d'expression de ces deux ARN messagers sont indépendants l'un de l'autre. Au niveau protéique, les données d'Arpin et de Tankyrase se superposent complètement ce qui indique une corrélation positive entre le niveau d'expression des deux protéines.

Ces résultats indiquent que la régulation du niveau d'expression d'Arpin et de Tankyrase se fait probablement de manière post-traductionnelle plutôt qu'au niveau transcriptionnel dans les lignées cellulaires étudiées, de façon cohérente avec les tests effectués *in vitro* qui montrent que le niveau d'expression des protéines Arpin et Tankyrase dépend l'un de l'autre.



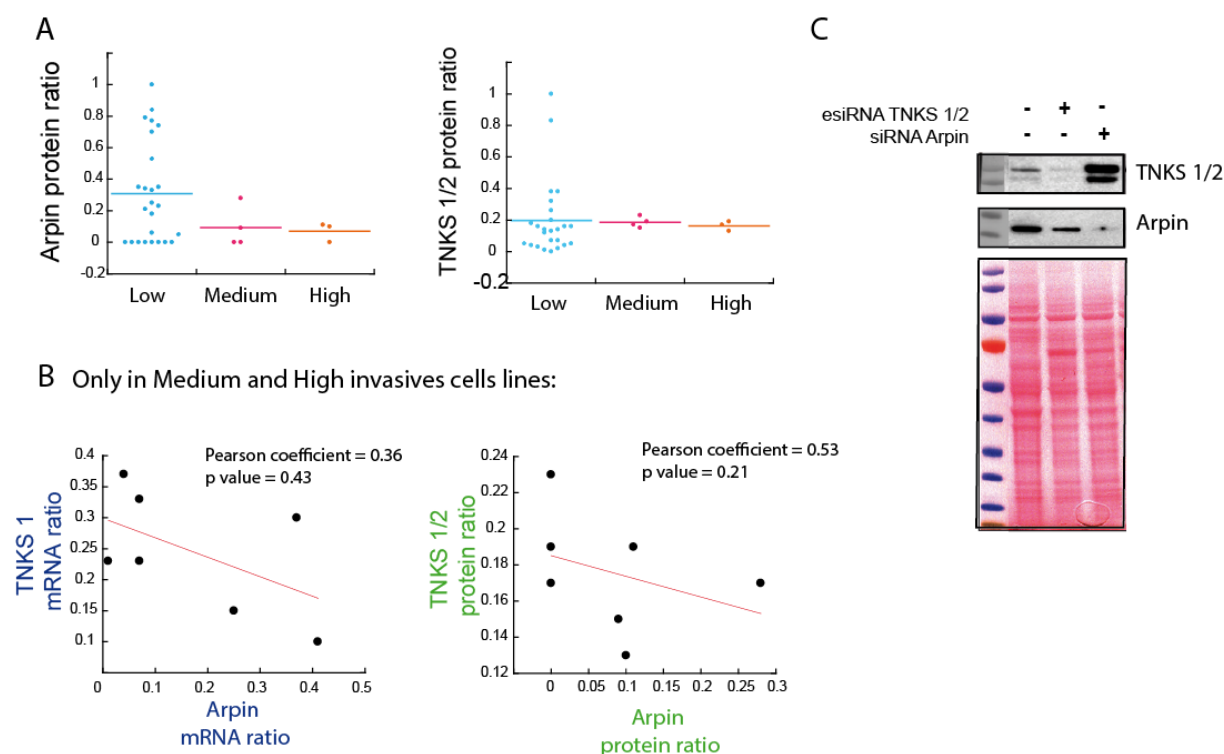
**Figure 13. Le niveau protéique d'Arpin et Tankyrase co-varient dans les lignées tumorales mammaires.** **A**, Trente et deux lignées de cellules tumorales mammaires ont été immunoblottées pour Arpin et TNKS1/2. En noir, est représenté les lignées faiblement ou non invasives, en orange, les lignées moyennement invasives et en rouge les lignées invasives. Le degré d'invasivité a été déterminé par test d'invasion en chambre de Boyden calibré par rapport à l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Invasivité: Faible (low) 0-40%, moyenne (medium) 40-80%, haute (high) >80% (Blick et al., 2008; Sommers et al., 1994). **B**, Il n'y a pas de corrélation entre les niveaux d'ARN messagers d'Arpin et de TNKS1 (Coefficient de Pearson=0.03, p value=0.85). Les niveaux protéiques d'Arpin et de TNKS1/2 sont légèrement corrélés (Coefficient de Pearson=0.32, p value=0.07). **C**, Analyse par composante principale. Les données d'ARNm messagers et protéiques d'Arpin et de TNKS ont été analysées par ACP et ont été représentées sur les deux axes qui expliquent le mieux les variations biologiques observées (Axe 1, PC1 représente 36% et l'Axe2, PC2, représente 25% des variations). Les niveaux d'ARNm d'Arpin et TNKS (flèches bleues) ne corrélaient pas tandis qu'au niveau protéique (flèches vertes) Arpin et TNKS corrélaient.

### 5.3. Perte de corrélation Arpin-Tankyrase en relation avec l'invasivité des lignées

Des études ont montré que le niveau d'expression de Tankyrase était augmenté dans de nombreux cancers (Lehtio et al., 2013) et en particulier dans le cancer du sein. En effet, l'augmentation du niveau d'expression de Tankyrase peut mener dans certains cas à l'augmentation de l'activation de la voie WNT responsable de certains cancers mais aussi contribuer à l'immortalité des cellules tumorales, en favorisant l'allongement des télomères. Actuellement, de nombreuses études se focalisent sur la recherche de molécules capables d'inhiber l'activité catalytique de Tankyrase (Lehtio et al., 2013; Riffell et al., 2012). Cependant, ces informations sont incohérentes avec les résultats obtenus précédemment dans lesquels, nous avons montré que les niveaux d'expressions protéiques d'Arpin et de Tankyrases corrèlent et que le niveau d'expression d'Arpin est sous-exprimé dans les cancers du sein invasifs (résultats obtenus en collaboration avec, Antonina Alexandrova, Blokhin Cancer Center, Moscou et Ivan Bièche, Institut Curie).

Dans le but de comprendre ces divergences, les niveaux d'expression messagers et protéiques des différentes lignées mammaires ont été classés en fonction de leur degré d'invasivité. En accord avec les résultats obtenus par nos collaborateurs (non montrés), les niveaux d'expressions d'Arpin sont bien diminués dans les lignées les plus invasives (Figure 14A, niveaux en ARN messagers non représentés). Le niveau d'expression de Tankyrase ne semblent pas varier de la même façon qu'Arpin et reste constant quelque soit le degré d'invasivité. Toutefois ces résultats ne montrent que des tendances. En effet au vu du nombre assez faible de lignées moyennement et très invasives les résultats ne sont pas significatifs. De manière surprenante, lorsque les niveaux d'expression sont analysés spécifiquement dans les lignées moyennement et fortement invasives, on observe une corrélation inverse. Plus le niveau d'Arpin en ARN messagers ou protéique est faible, plus le niveau de Tankyrase augmente (Figure 14B). Pour confirmer cet effet, une autre lignée de cellules cancéreuses connue pour être très invasives, les cellules HeLa ont été déplétées pour Arpin et Tankyrase et les niveaux des protéines respectives ont été évalués (Figure 14C). La déplétion de Tankyrase réduit légèrement le niveau d'Arpin alors que la déplétion d'Arpin augmente considérablement le niveau de Tankyrase contrairement aux résultats obtenus dans la lignée immortalisée hTERT-RPE1.

Les résultats obtenus justifient la corrélation faible entre les niveaux d'expression dans les lignées cellulaires et témoignent de la diversité et de la complexité de mécanismes de régulation dans les lignées tumorales. Toutefois, les résultats obtenus suggèrent que plus les lignées tumorales sont invasives, plus la corrélation est perdue entre les niveaux d'expressions d'Arpin et Tankyrase.



**Figure 14. La corrélation entre Arpin et Tankyrase est perdue dans les lignées invasives.** **A**, Les niveaux d'expression protéiques d'Arpin et de TNKS ont été classés en trois groupes : lignées peu invasives (low), lignées moyennement invasives (medium) et lignées très invasives (high). Le niveau d'expression d'Arpin diminue plus les lignées sont invasives, tandis que le niveau de TNKS semble rester constant. **B**, Les niveaux en ARN messagers et en protéines d'Arpin et TNKS corrélient négativement dans les lignées moyennement et fortement invasives (ARNm : Coefficient de Pearson=0.36, p value=0.43 ; Protéines : Coefficient de Pearson=0.53, p value=0.21). **C**, Les cellules HeLa ont été déplétées en Arpin ou en TNKS1/2. Lorsque TNKS1/2 est déplétée, le niveau d'Arpin diminue légèrement tandis que lorsqu'Arpin est déplétée, le niveau endogène de TNKS est fortement augmenté.

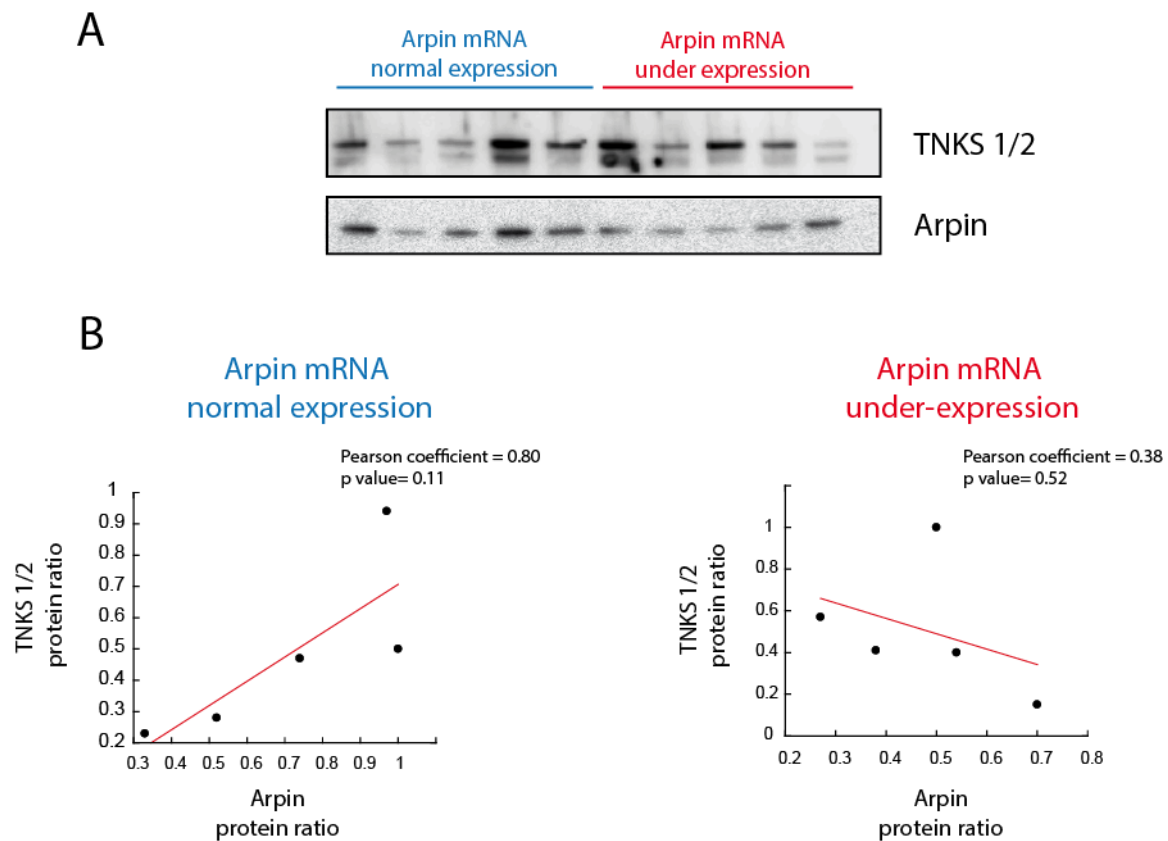
## 5.4. Corrélation dans les extraits de tumeurs

Pour appuyer la véracité des corrélations observées entre les niveaux d'Arpin et Tankyrase et la relation avec l'invasivité des lignées, nous avons travaillé avec dix extraits protéiques issus de biopsies de patientes atteintes de tumeurs du sein (fourni par Ivan Bièche, Institut Curie). Ces extraits ont été classés en deux groupes : cinq extraits protéiques sous-exprimant Arpin au niveau ARN messagers et cinq extraits exprimant Arpin à niveau normal. Comme nous l'avons expliqué précédemment, nos résultats brevetés suggèrent que les tumeurs sous-exprimant Arpin correspondent aux tumeurs les plus invasives.

De manière intéressante, on observe immédiatement une incohérence entre le niveau d'expression en ARN messagers et en protéines d'Arpin. En effet, les cinq tumeurs sélectionnées comme étant sous-exprimées pour Arpin au niveau ARNm, montrent des niveaux d'expression protéiques assez semblables aux tumeurs exprimant normalement Arpin au niveau ARNm (Figure 15A) ce qui appuie de nouveau l'hypothèse que le niveau d'expression d'Arpin est régulé au niveau



post-traductionnel. D'autre part, l'étude des corrélations dans ces extraits de tumeurs confirment les résultats obtenus précédemment dans les lignées cellulaires mammaires. Dans les tumeurs les moins invasives exprimant Arpin à un niveau normal, Arpin et Tankyrase ont tendance à varier ensemble. Au contraire, dans les tumeurs possiblement étant les plus invasives en sous-exprimant Arpin au niveau ARNm, la corrélation est perdue et apparaît même légèrement inversée, même si cette tendance n'est pas significative (Figure 15B).



**Figure 15. La corrélation entre le niveau protéique d'Arpin et TNKS est perdue dans les tumeurs sous-exprimant Arpin en ARN messagers. A,** Dix extraits de tumeurs issus de patientes atteintes de cancer du sein ont été analysés par western blot: cinq ont été quantifiés comme exprimant un niveau normal d'Arpin (Arpin mRNA normal expression, bleu), cinq sous-exprimants Arpin (Arpin mRNA under expression, rouge). **B,** Dans les tumeurs exprimant un niveau normal d'ARN messagers d'Arpin, les protéines Arpin et TNKS corrélaient légèrement. Au contraire, dans les tumeurs sous exprimant Arpin au niveau ARN messenger, la corrélation est inversée.

## Conclusions

Dans cette étude, nous avons identifié un nouveau partenaire d'Arpin, la protéine Tankyrase. Nous avons caractérisé l'interaction entre ces deux protéines, et identifié les résidus requis pour cette interaction. Nous avons pu observer que le site d'interaction à Tankyrase était situé dans la queue acide d'Arpin nécessaire à l'interaction avec Arp2/3. Et effectivement *in vitro* Tankyrase et Arp2/3 sont en compétition au niveau de cette séquence pour l'interaction avec Arpin. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse de l'éventuel rôle de Tankyrase sur la régulation d'Arpin. De manière plus précise, Tankyrase pourrait empêcher Arpin d'inhiber le complexe Arp2/3 au lamellipode et ainsi favoriser la protrusion du lamellipode, favoriser la migration cellulaire et même l'invasion tumorale. De plus, il serait donc intéressant de comprendre par quels signaux est déclenchée cette interaction, à quel endroit de la cellule elle a lieu et quelle est la conséquence de cette interaction. Des études fonctionnelles seront à réaliser pour confirmer ces hypothèses

Nos études de corrélations entre les niveaux d'expression d'Arpin et Tankyrase montrent que ces deux protéines co-varient dans les lignées cellulaires et les lignées les moins invasives (lignées et tumeurs). Ces résultats suggèrent que dans ces lignées, l'activité d'Arpin pourrait toujours être régulée par Tankyrase. Dans les cellules invasives, un mécanisme encore inconnu, entraîne la perte d'expression d'Arpin d'une part et d'une augmentation de l'expression de Tankyrase d'autre part. Ensemble, ces variations d'expression pourraient contribuer à l'invasivité des tumeurs, par l'augmentation de la motilité cellulaire dû par la perte d'expression d'Arpin, et au maintien de l'immortalité des cellules, par l'allongement de la taille des télomères dû à la surexpression de Tankyrase.

– Troisième partie –

# Discussion

## 1. Arpin contrôle la migration cellulaire

La cellule migre grâce à la force générée par la polymérisation du réseau d'actine branché au front de migration médiée par le complexe Arp2/3. Cependant, la manière dont le réseau d'actine branché est régulé et modulé au lamellipode n'est pas encore bien comprise. Nous avons découvert, Arpin, un nouvel inhibiteur du complexe Arp2/3. De façon similaire aux inhibiteurs connus, PICK1 et Gadkin, Arpin interagit avec le complexe Arp2/3 via un motif acide contenant un tryptophane. Cependant, contrairement à PICK1 et Gadkin qui inhibe le complexe Arp2/3 au niveau des sites d'endocytose ou des endosomes, Arpin est le premier inhibiteur du complexe Arp2/3 identifié au lamellipode.

### 1.1. La régulation de la persistance du lamellipode

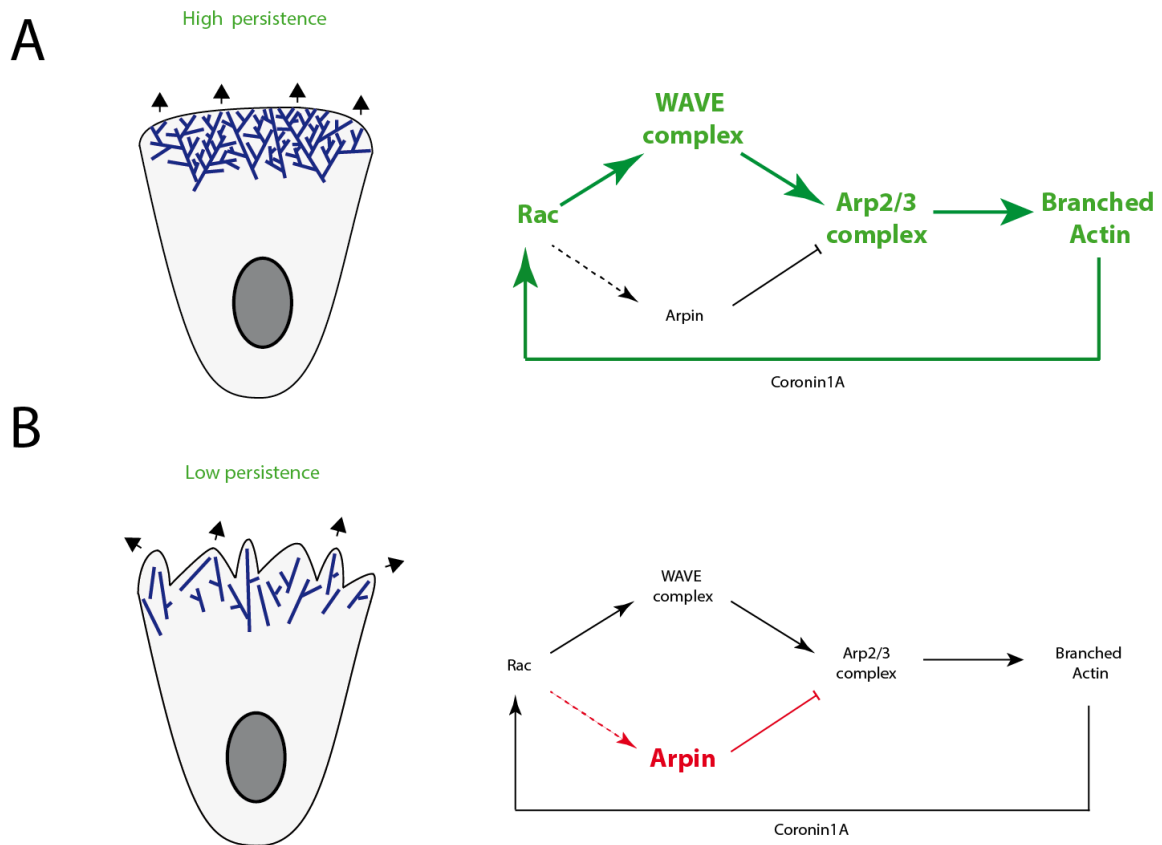
Arpin, inhibe la formation d'actine branchée au front de migration de la cellule et réduit la persistance du lamellipode, entraînant des changements de directions de la cellule au cours de la migration cellulaire. Pour migrer de manière persistante, la cellule doit maintenir une signalisation active au front de migration dans le but de maintenir le lamellipode dans une direction. Il est depuis longtemps reconnu que la migration cellulaire est régulée par des boucles de rétroactions positives et négatives (Brandman and Meyer, 2008; Danuser et al., 2013). La succession de boucle de rétroactions positives et négatives créent des mouvements oscillatoires, comme les mouvements successifs de protrusions et de rétractions des lamellipodes observés lors de la migration aléatoire de cellules, qui relate du caractère transitoire du lamellipode.

La boucle de rétroaction positive au front de migration du lamellipode permet d'activer la polymérisation d'actine là où elle a déjà été polymérisée et de maintenir la persistance du lamellipode et la directionnalité de la migration. Cette boucle de rétroaction implique la petite GTPase Rac qui est régulée par une variété de GEFs comme TIAM1, Vav2, Trio,  $\beta$ -Pix et DOCK, et des protéines activant les GTPases comme srGAP et SH3BP1 (Bos et al., 2007) même si leurs contributions respectives n'est pas claire. La régulation positive la mieux caractérisée est celle qui implique Rac-GTP et PIP3. Dans la cellule polarisée, la signalisation par les intégrines active la PI3K qui augmente le niveau de PIP3 au front de migration. PIP3 permet de recruter Rac qui est alors activé par les GEFs. L'activation de Rac permettrait de recruter encore plus de GEFs de manière synergique avec le maintien du niveau de PIP3 qui recruterait encore plus de Rac (Weiner et al., 2002). D'autre part  $\beta$ -Pix, qui active Rac en réponse la polymérisation d'actine grâce à sa capacité à interagir avec Coronin1A, serait capable de reconnaître l'actine-F contenue dans les lamellipodes et d'activer Rac en retour (Castro-Castro et al., 2011).

L'existence de boucles de rétroactions antagonistes est connue et décrite pour de nombreux processus homéostasiques. Celles-ci permettent de contrôler et d'éviter une sur-activation des boucles de rétroactions positives. A ce jour aucun système n'a encore été décrit pour la régulation des boucles de rétroactions positives de Rac. Comment le lamellipode fait-il pour éviter une sur-activation de Rac? Quand Rac est suractivé, la persistance de migration diminue car la cellule génère des protrusions excessives tout autour de la cellule qui perd alors sa polarité. Au contraire un niveau correct de Rac activé favorise la persistance et la directionnalité de migration en 2D et en 3D via le maintien de la polarité de la cellule (Pankov et al., 2005). Nous avons découvert qu'Arpin est un inhibiteur du complexe Arp2/3 et antagonise de ce fait la voie de signalisation du lamellipode Rac/WAVE/Arp2/3. De manière surprenante, nous avons constaté qu'Arpin est elle-même activée par Rac. Par conséquent l'activation d'Arpin par Rac constitue une boucle de rétroaction négative imbriquée dans la boucle d'activation positive de Rac. Ces voies de signalisations antagonistes et parallèles expliquent pourquoi le lamellipode peut présenter des mouvements oscillatoires de protrusions et de rétractions où la boucle de rétroaction négative est retardée par rapport à la boucle d'activation positive. Ce type de régulation où l'activateur active à la fois un régulateur positif et un régulateur négatif est appelé « incoherent Feed-Forward loop ». Ce modèle computationnel a été appliqué à la migration cellulaire par Hans Meinhardt (Meinhardt, 1999) cependant tous les composants moléculaires correspondants à chaque paramètre n'étaient pas encore identifiés, en particulier l'inhibiteur dans la boucle de régulation négative. Aujourd'hui, on sait qu'Arpin est un excellent candidat à ce poste au vu de son rôle d'inhibiteur négatif de la migration cellulaire (Figure I).

## 1.2. Arpin contrôle la vitesse et la directionnalité de migration

Nous avons montré que la déplétion d'Arpin dans les cellules entraînait une augmentation de la vitesse de migration et une augmentation de la directionnalité des trajectoires de migration. Cependant il n'est pas clair si les rôles d'Arpin dans le contrôle de la persistance des lamellipodes et dans le contrôle des paramètres de vitesse et de directionnalité dans la migration cellulaire aléatoire sont liés. L'analyse détaillée des trajectoires de migration des cellules déplétées en Arpin (*Dictyostélium Discoidium* et MDA-MB-231) ou celles micro-injectées en Arpin purifiée dans l'expérience gain-de-fonction réalisée chez le kératocyte de poisson (Dang et al., 2013) montrent qu'Arpin contrôle la durée de la phase active de migration en augmentant la durée des épisodes de pauses, c'est-à-dire les périodes pendant lesquelles les cellules s'arrêtent de migrer (Gorelik & Gautreau, en préparation). Ces observations sont consistantes avec l'augmentation de la vitesse de migration observée en absence d'Arpin et cohérentes avec le rôle d'Arpin comme acteur de la boucle antagoniste négative dans l'« incoherent feedforward loop » qui inhibe temporairement la formation du lamellipode. De manière intéressante, ces épisodes de pauses, induites par Arpin sont suivies d'un changement de direction ce qui suggère que ces pauses, permettraient à la cellule de réorganiser



**Figure I. Le contrôle de la persistance des lamellipodes par l'« incoherent feed-forward loop ».** **A**, Pour maintenir une protrusion persistante et directionnelle, la boucle rétroaction positive est sur-activée, lorsque l'activité d'Arpin est faible. Cette polymérisation dirigée au front de migration est maintenue par la boucle de rétroaction positive où Coronin1A, un senseur de l'actine branchée, maintient l'activation de Rac. **B**, Lorsque la boucle de rétroaction positive est antagonisée par une forte activité d'Arpin, le taux d'actine branchée diminue et le lamellipode est moins persistant.

son cytosquelette d'actine et seraient à l'origine des changements de directions observés. Ainsi, ces résultats montrent que les paramètres de vitesse et de directionnalité contrôlés par Arpin sont interconnectés dans la migration cellulaire aléatoire. De ce fait, on peut attribuer à Arpin l'image du frein de la migration cellulaire qui favorise alors les changements de direction de la cellule.

### 1.3. Arpin n'est pas essentielle au processus de chimiotaxie

La découverte d'Arpin, ouvre la voie à la compréhension de nombreux mécanismes impliquant la migration cellulaire, tels que la migration au cours du développement, la migration dans les processus d'immunité ou la migration au cours de processus d'invasion. Dans tous ces processus, les cellules sont orientées grâce à la sécrétion de molécules chimio-attractantes. Récemment de nombreux laboratoires ont proposé des modèles computationnels qui expliquent mieux la formation rapide d'un lamellipode en réponse à un stimulus. Les lamellipodes se formeraient de manière

cyclique aléatoirement tout autour de la cellule. En présence de chimio-attractant, le cycle serait modulé et favoriserait la polymérisation d'actine vers la source. Cela suggère donc que le mécanisme de chimiotaxie est régulé par une modification du comportement intrinsèque des lamellipodes plutôt que par la formation d'un nouveau lamellipode (Neilson et al., 2011). Pour expliquer ces comportements, d'autres modèles computationnels ont proposé l'existence de patches de molécules senseurs localisés tout autour de la cellule non-stimulée et responsables du réseau excitable (EN: excitable network) qui répond par la formation d'un lamellipode à la suite d'une stimulation au dessus d'un certain seuil (BEN : biaise EN). Ces patches de molécules senseurs seraient maintenus à un état basal par un mécanisme d'inhibition globale (LEGI : local excitation-global inhibition) (Huang et al., 2013; Neilson et al., 2011). Ce modèle d'excitabilité LEGI-BEN (Iglesias and Devreotes, 2012; Xiong et al., 2010), a été utilisé pour expliquer, par exemple, les mouvements oscillatoires observés du lamellipode. Ces modèles sont consolidés par de nombreuses observations en microscopie TIRF qui ont révélé la présence de « vagues » de propagations de protéines du cytosquelette dont la protéine WAVE, ou de protéines de signalisation comme PIP3 ou Ras. L'existence de ces vagues de propagations dans les systèmes biologiques renforce l'existence d'un réseau excitable. Cependant aucun composant n'a été proposé pour contrôler le mécanisme d'inhibition globale. Ainsi, suite à la découverte d'Arpin, deux laboratoires ont suggéré qu'Arpin, qui inhibe la formation des lamellipodes pourrait remplir cette fonction (Schmick and Bastiaens, 2014; Veltman, 2014).

Nous avons montré, dans deux systèmes différents, l'amibe *Dictyostelium Discoideum* et la lignée de cellules humaines MDA-MB-231, que la déplétion d'Arpin n'affectait pas la capacité des cellules à s'orienter et à migrer correctement vers le gradient de molécules chimio-attractantes. Ces résultats sont concordants avec l'absence de défauts de chimiotaxie observés suite à la déplétion du complexe Arp2/3 (Wu et al., 2012; Wu et al., 2013). Ces différentes expériences ont été réalisées en présence de gradients fixes de molécules chimio-attractantes. On sait néanmoins qu'*in vivo* les cellules sont soumises à des changements dynamiques dans l'espace et dans le temps des gradients de molécules, comme par exemple, lors de la chasse de bactéries par les leucocytes. Ce niveau de complexité supplémentaire *in vivo* laisse penser qu'Arpin pourrait jouer un rôle plus important dans ces systèmes dynamiques où la cellule nécessite de réorienter et de moduler rapidement son cytosquelette d'actine. Il serait donc intéressant d'étudier, dans un premier temps *in vitro*, le comportement des cellules en réponse à des changements d'orientation du gradient, en déplaçant par exemple la micropipette (contenant le chimio-attractant) dans les tests de chimiotaxie chez *Dictyostelium*.

Par ailleurs, il a été montré que la déplétion du complexe Arp2/3 dans les cellules entraînait un défaut de réponse à un gradient de matrice extracellulaire, processus appelé haptotaxie (Wu et al.,

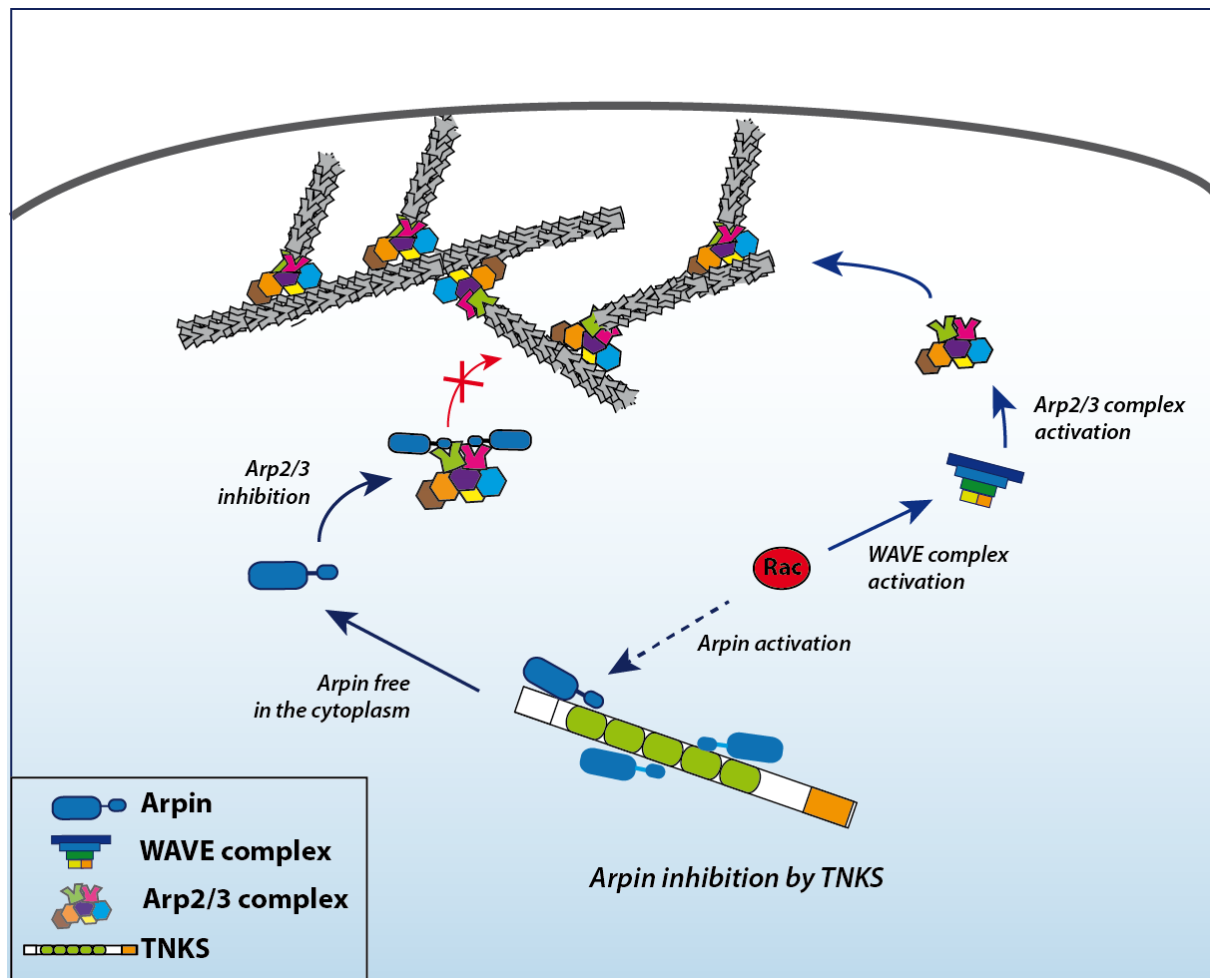
2012). Les auteurs expliquent ce défaut par un alignement incorrect des adhésions focales au niveau des lamellipodes. Ainsi, le rôle d'Arpin dans ce processus reste encore à élucider.

#### **1.4. L'activité d'Arpin est régulée dans la cellule**

Le contrôle de l'activité d'Arpin est important pour la régulation rigoureuse de la migration cellulaire. Les résultats obtenus au cours de ma thèse démontrent qu'Arpin est présente sous une forme « active » ou sous une forme « inactive » dans la cellule puisqu'elle n'interagit avec le complexe Arp2/3 qu'en présence de la petite GTPase Rac. Nous avons montré que cette l'interaction Rac-Arpin n'était pas directe suggérant qu'un intermédiaire jouait le rôle d'activateur d'Arpin. Nous avons identifié Tankyrase comme protéine interagissant directement avec Arpin. Contrairement à notre hypothèse de départ l'interaction avec Tankyrase ne semble pas dépendante de la voie de signalisation Rac, suggérant que Tankyrase n'active pas Arpin. Effectivement, nous avons montré que Tankyrase inhibe l'activité d'Arpin *in vitro*: l'interaction Arpin-Tankyrase est en compétition avec l'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3. Il serait maintenant intéressant de voir si l'interaction Arpin-Tankyrase abolie la capacité d'Arpin à inhiber le complexe Arp2/3 dans un test de polymérisation *in vitro* par exemple. Si c'est le cas, que se passe-t-il dans la cellule : augmenter l'interaction Arpin-Tankyrase favoriserait-elle la protrusion du lamellipode?

Si nous avons montré que Tankyrase intervient probablement dans l'inhibition de l'activité d'Arpin, la question sur l'activation d'Arpin reste encore en suspens. De façon intrigante, nous avons montré au cours de nos travaux que la protéine Arpin purifiée de bactérie était constitutivement active, suggérant qu'Arpin serait maintenue inactive dans la cellule. Tankyrase qui interagit avec Arpin, pourrait jouer un rôle important dans cette dernière hypothèse. Ainsi, si l'interaction entre Arpin et Tankyrase était constitutive dans la cellule, inhibant sa capacité à interagir avec le complexe Arp2/3, le mécanisme d'action proposé serait le suivant (Figure II). Dans une cellule exprimant un niveau basal, d'Arpin et de Tankyrase, une partie d'Arpin inhibe le complexe Arp2/3 tandis que l'autre partie est maintenue inactive par l'interaction avec Tankyrase. En présence de Rac activé, le complexe WAVE est activé et induit la polymérisation d'actine branchée par le complexe Arp2/3 à la membrane. Rac activerait Arpin en induisant sa dissociation avec Tankyrase. Arpin libre dans le cytoplasme peut alors inhiber une partie du complexe Arp2/3 pour éviter une suractivation de la voie. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant par exemple, de dépléter Tankyrase et de voir si l'interaction avec le complexe Arp2/3 augmente et inhibe la formation des lamellipodes des cellules. Au contraire, la surexpression de Tankyrase, pourrait favoriser la séquestration d'Arpin et induirait la formation de lamellipodes.





**Figure II. Modèle hypothétique du mécanisme de régulation de l'activité d'Arpin.** Dans une cellule exprimant Arpin et Tankyrase à un niveau basal, la petite GTPase Rac active d'une part, le complexe WAVE qui active le complexe Arp2/3 aboutissant à la polymérisation d'actine branchée. Arpin, qui serait à l'état basal liée à Tankyrase, est aussi activée par Rac qui provoquerait sa dissociation de Tankyrase. Une fois libre dans le cytoplasme, Arpin inhibe le complexe Arp2/3.

D'autre part, l'activation de protéines peut se faire de manière très transitoire, ce qui expliquerait pourquoi aucunes autres protéines que Tankyrase n'ont pu être détectées comme interagissant avec Arpin. Nous avons montré clairement qu'Arpin nécessitait la présence de Rac pour jouer son rôle inhibiteur. Les protéines PAK (p21-activated kinase) pourraient jouer ce rôle d'intermédiaire entre Rac et Arpin. En effet les protéines PAK sont des sérine/thréonine kinases effectrices de Rac qui jouent un rôle important dans de nombreux processus dont la migration cellulaire (Sells et al., 1999). PAK peut être localisé au lamellipode où il phosphoryle des protéines du cytosquelette comme par exemple, la sous-unité du complexe Arp2/3, ArpC1b ce qui favorise l'assemblage du complexe (Vadlamudi et al., 2004). Il serait donc intéressant de voir si Arpin est phosphorylé par PAK, ce qui pourrait induire son éventuelle dissociation avec Tankyrase, selon notre modèle de régulation décrit précédemment.

## 2. Rôles putatives d'Arpin dans les cancers

### 2.1. Rôle d'Arpin dans la progression tumorale

La déplétion d'Arpin dans les cellules MDA-MB-231, augmente la vitesse et la directionnalité des cellules dans des expériences *in vitro* en 2D mais aussi dans une matrice de collagène en 3D. De manière intéressante, nos collaborateurs ont constaté que plus les tumeurs étaient à un stade avancé, plus l'expression d'Arpin était perdue (non publié). Ces résultats vont dans le sens que la perte d'expression d'Arpin pourrait être impliquée dans la progression et l'invasion tumorale. Une des étapes clés de la tumorigénèse d'une cellule épithéliale est le processus d'EMT au cours duquel la cellule adopte les caractéristiques d'une cellule mésenchymateuse: perte des contacts cellules-cellules, perte de la polarité baso-latérale, individualisation et acquisition des capacités migratoires entre autres. Au niveau moléculaire, de nombreuses modifications entrent en jeu, comme l'augmentation de l'expression de facteurs de transcriptions, l'expression de protéines de surfaces spécifiques, la production de protéases dégradant la matrice extracellulaire, la réorganisation et la surexpression de protéines du cytosquelette. La plupart des facteurs impliqués dans l'EMT sont aussi utilisés comme bio-marqueurs de l'EMT. On peut citer par exemple la perte de l'E-cadhérine au cours de l'EMT, ou la surexpression de facteurs de transcriptions comme SNAIL (Cano et al., 2000). Au vu des résultats obtenus par nos collaborateurs, nous avons proposé Arpin, comme facteur pronostic dans le cancer du sein (Brevet Européen n°13306198.6). On peut penser que la perte d'Arpin est associée au processus d'EMT, au cours duquel tous les mécanismes de migration sont réactivés. Afin de tester cette hypothèse, nous disposons de cellules épithéliales mammaires, MCF7 qui peuvent de façon inductible, engager une transition épithélio-mésenchymateuse, par l'expression du facteur de transcription Snail (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). L'étude du niveau d'expression d'Arpin dans ces différentes conditions et la localisation d'Arpin au cours de l'EMT permettraient d'apporter des réponses à cette hypothèse. De cette façon, si une perte d'expression d'Arpin est détectée au cours de l'EMT, il serait intéressant de connaître les mécanismes par lesquels l'expression d'Arpin est éteinte. On peut supposer une régulation de type ARN interférents (i.e miRNA), pour lesquels on observe une surexpression au cours de l'EMT (Gregory et al., 2008) ou encore une régulation transcriptionnelle par une modification d'expression de facteurs de transcriptions. Par ailleurs, il a été montré que le complexe WAVE, impliquant la sous-unité WAVE2, induit la formation de lamellipodes qui contribuent à l'adhérence cellule-cellule des cellules épithéliales (Yamazaki et al., 2007). La présence du complexe WAVE au niveau des jonctions adhérentes suggère fortement la présence d'Arpin qui jouerait son rôle de régulateur négatif de la voie Rac/WAVE/Arp2/3. Ainsi, la perte d'expression d'Arpin pourrait contribuer à l'EMT en déstabilisant les jonctions cellules-cellules et en favorisant leur individualisation.

Une fois individualisée, la cellule cancéreuse dégrade la lame basale sur laquelle elle reposait et migre à travers la matrice extracellulaire pour envahir l'organisme. La dégradation de la matrice se fait grâce aux invadopodes qui sont des protrusions de membranes riches en actine, générées au niveau ventral de la cellule. Ces protrusions sont formées pour libérer des protéases dans le but de dégrader la matrice extracellulaire. Les invadopodes sont générés suite à l'activation de la voie Cdc42/N-WASP/Arp2/3 qui induit la formation d'un réseau d'actine branché (Yamaguchi et al., 2005). Arpin, inhibiteur du complexe Arp2/3 au niveau des lamellipodes, pourrait aussi être localisé au niveau des invadopodes et inhiber la fonction de nucléation du complexe Arp2/3. Pour étudier cette hypothèse, il suffirait de localiser Arpin par immunofluorescence dans des cellules tumorales qui forment des invadopodes et qui seraient étalées sur une matrice. On peut ensuite suggérer que la déplétion d'Arpin, puisse entraîner une augmentation de l'activité de dégradation de la matrice par une formation excessive d'invadopodes ou au contraire, l'absence d'inhibition de l'activité d'Arp2/3 peut entraîner, une formation accrue d'actine branchée qui rend la formation d'invadopodes inefficace.

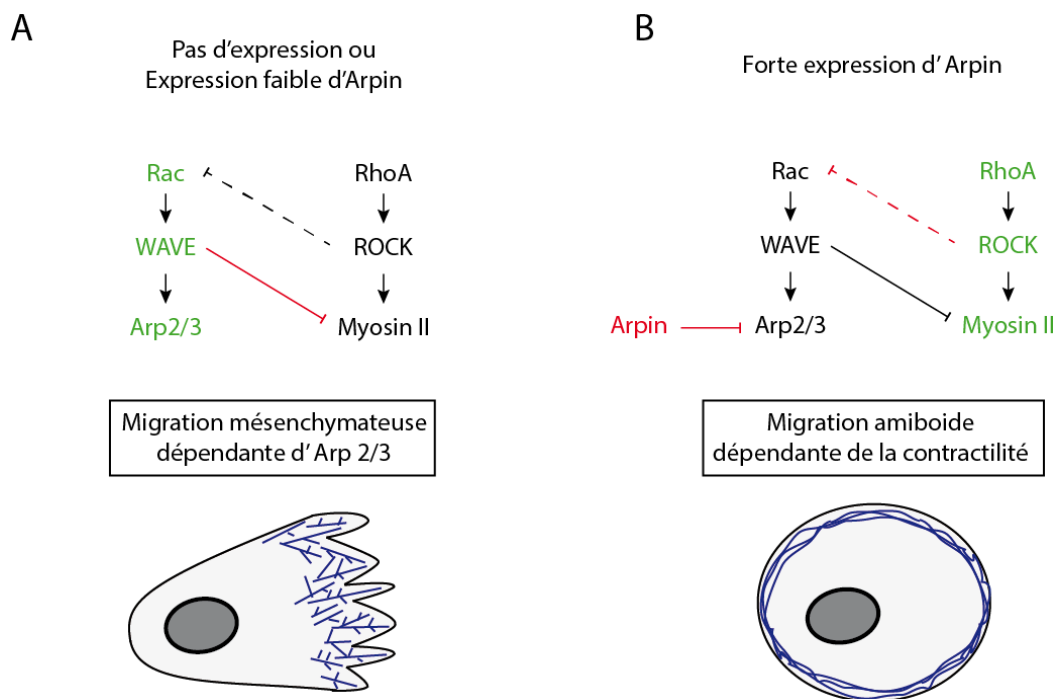
## **2.2. Arpin contrôle la transition entre les modes de migration**

Lors du processus de tumorigénèse, la cellule épithéliale est convertie en cellule mésenchymateuse via le processus d'EMT et acquiert des capacités migratoires. Par la suite, pour envahir l'organisme, la cellule tumorale migre à travers la matrice extracellulaire (EMC). *In vivo*, les cellules migrent à travers différents types d'EMC qui varient en architecture et en densité. En présence d'un réseau dense de matrices, les cellules ont tendances à migrer de façon protéase-dépendantes par la migration de type mésenchymateuse alors qu'en présence d'un réseau plus lâche, elles sont capables de passer à travers les mailles de l'EMC par la migration de type amiboïde. Des études ont montré que les cellules mésenchymateuses traitées par des inhibiteurs de protéases étaient toujours capables de migrer à travers l'EMC en transitant vers le mode de migration amiboïde (Wolf et al., 2003). Ainsi, en plus de l'EMT, les cellules tumorales peuvent alterner entre les modes de migration via le processus de transition mésenchymateuse-amiboïde (voir introduction, chapitre I).

La migration amiboïde, impliquant la voie RhoA/ROCK/MyosineII émerge actuellement comme le mode privilégié d'invasions des tissus par les cellules tumorales. En effet, l'activité de la voie RhoA est corrélée à la progression des tumeurs mammaires (Fritz et al., 1999). Dans la lignée MCF-7, la surexpression *in vitro* de RhoA, augmente la migration et l'invasion (Rosman et al., 2008). L'utilisation de siRNA ciblant RhoA inhibe l'invasion des cellules MDA-MB-231 à travers du matrigel (Poincloux et al., 2011), et diminue de 85% la taille des tumeurs chez des souris xénogreffées (Pille et al., 2005). Cependant, il faut noter que les travaux de Poincloux et al, 2011, montrent que les cellules MDA-MB-231 ne migrent ni par extension de pseudopodes, ni de blebs à l'avant de la cellule

dans une matrice en 3D. En effet, c'est la contractilité de l'arrière de la cellule (uropodes) qui implique la voie RhoA/ROCK/Myosine II qui permet aux cellules de se déplacer dans la matrice.

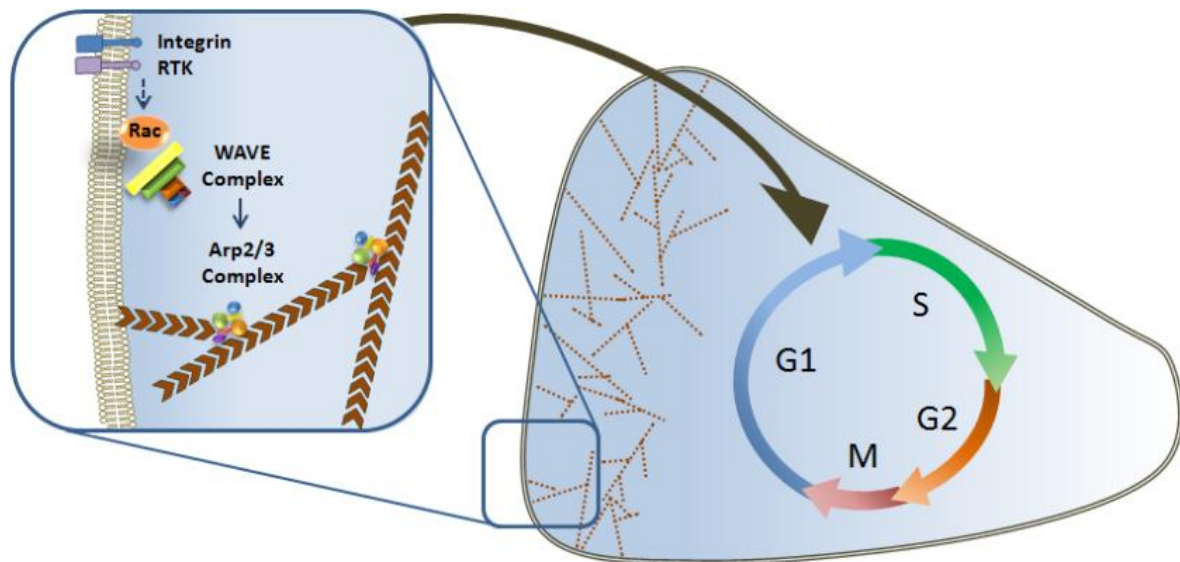
Arpin, n'est pas exprimée dans une la lignée tumorale mammaire, MCF-7. Ces cellules sont très peu invasives comparées à la lignée MDA-MB-231, très invasive, dans laquelle Arpin est exprimée. Ces observations pourraient être expliquées par le fait qu'Arpin serait capable d'inhiber la migration de type mésenchymateuse qui implique la voie Rac/WAVE/Arp2/3, via l'inhibition du complexe Arp2/3, et favoriser la transition vers la migration amiboïde, puisque les voies Rac et Rho sont antagonistes (Figure III). De façon cohérente, des travaux récents ont montré que l'inhibition du complexe Arp2/3 induit, dans les cellules épithéliales MCF-10A, la formation de protrusions apparentées à des blebs (Beckham et al., 2014). Pour comprendre l'implication d'Arpin dans la MAT, il serait intéressant de dépléter Arpin dans des lignées tumorales connues pour migrer de manière amiboïde et de voir si cette déplétion induit une réduction de l'invasivité des cellules ou un basculement vers une migration mésenchymateuse. Au contraire, la surexpression d'Arpin pourrait inhiber la forme allongée des cellules mésenchymateuses et les faire transiter vers le mode de migration amiboïde.



**Figure III. Arpin pourrait être impliquée dans la transition mésenchymateuse-amiboïde. A,** Dans les cellules n'exprimant pas ou peu d'Arpin, la voie de signalisation impliquant Rac/WAVE/Arp2/3 n'est pas inhibée et favorise la formation d'actine branchée, induisant la migration de type mésenchymateuse dépendante d'Arp2/3. Le complexe WAVE contribue à inhiber la MyosinII. **B,** Dans les cellules exprimant fortement Arpin, la voie Rac/WAVE/Arp2/3 est inhibée par Arpin et favorise la voie RhoA/ROCK/MyosinII. ROCK contribue aussi à inhiber la voie RAC/WAVE/Arp2/3 en inhibant indirectement Rac. La contractilité de la cellule augmente et favorise la migration de type amiboïde.

### 2.3. Rôle d'Arpin dans le contrôle de la prolifération cellulaire

La polymérisation d'actine branchée est impliquée dans la migration cellulaire, dans le remodelage de membranes et dans le trafic intracellulaire. Des observations récentes montrent qu'elle pourrait jouer un rôle complémentaire dans la régulation de la prolifération cellulaire (Dang and Gautreau, 2012). L'inhibition de la polymérisation de l'actine par des drogues ou l'inactivation du complexe Arp2/3 conduisent au blocage des cellules en phase G1 dans les cellules non transformées (Maness and Walsh, 1982; Wu et al., 2012). Cet effet n'est cependant pas dû à un défaut structural qui empêcherait les cellules d'entrer en phase G1, puisque la déplétion de gènes suppresseurs de tumeurs, comme p53 ou Rb, rétablit la progression dans le cycle cellulaire. Ces résultats suggèrent que le réseau d'actine branché pourrait être détecté, et qu'en retour, un signal d'« activation » ou d'« inhibition » est délivré à la machinerie du cycle cellulaire. Ce point de contrôle (ou checkpoint) apparaît similaire au point de contrôle SAC (« spindle assembly checkpoint ») qui contrôle l'attachement correct des chromosomes le long du fuseau mitotique lors de la métaphase. Par conséquent, de la même façon que le contrôle des microtubules, les filaments d'actines branchés pourrait être soumis à un point de contrôle que nous avons appelé BAC pour « Branched Actin Checkpoint » (Dang and Gautreau, 2012). Pour proliférer, les cellules adhèrent au substrat via les intégrines et ont besoin de s'étaler en formant des lamellipodes jusqu'à atteindre une surface minimal avant de pouvoir entrer en mitose (Chen et al., 1997). Ces observations suggèrent que le point de contrôle BAC puisse être contrôlé par la voie de signalisation impliquant les intégrines qui active Rac en collaboration avec les récepteurs à tyrosines kinases (RTK) (Assoian and Schwartz, 2001; Mettouchi et al., 2001). La déplétion des NPFs N-WASP, WASP, WASH et WAVE2 dans des cellules MEF immortalisées, non transformées, montrent que seule l'absence de WAVE2 est capable d'inhiber la prolifération des cellules, qui suggère que c'est le réseau d'actine branché localisé au lamellipode qui est sous le contrôle du BAC (figure IV). Il est depuis longtemps reconnu qu'une des propriétés phénotypique des cellules transformées est la perte de dépendance vis-à-vis de l'ancrage: les cellules prolifèrent dans des milieux semi-solides en suspension (par exemple dans de l'agar mou) indépendamment de l'interaction avec leur environnement (Freedman and Shin, 1974; Shin et al., 1975). Cette propriété laisse à penser à une altération des mécanismes de contrôle de l'adhérence et une perte probable du point de contrôle BAC dans les cellules transformées. Par conséquent, une régulation correcte du réseau d'actine branché au lamellipode semble importante, non seulement pour une migration cellulaire efficace, mais aussi pour le contrôle de l'entrée dans le cycle cellulaire. Arpin pourrait alors tenir une place importante dans ce contrôle.



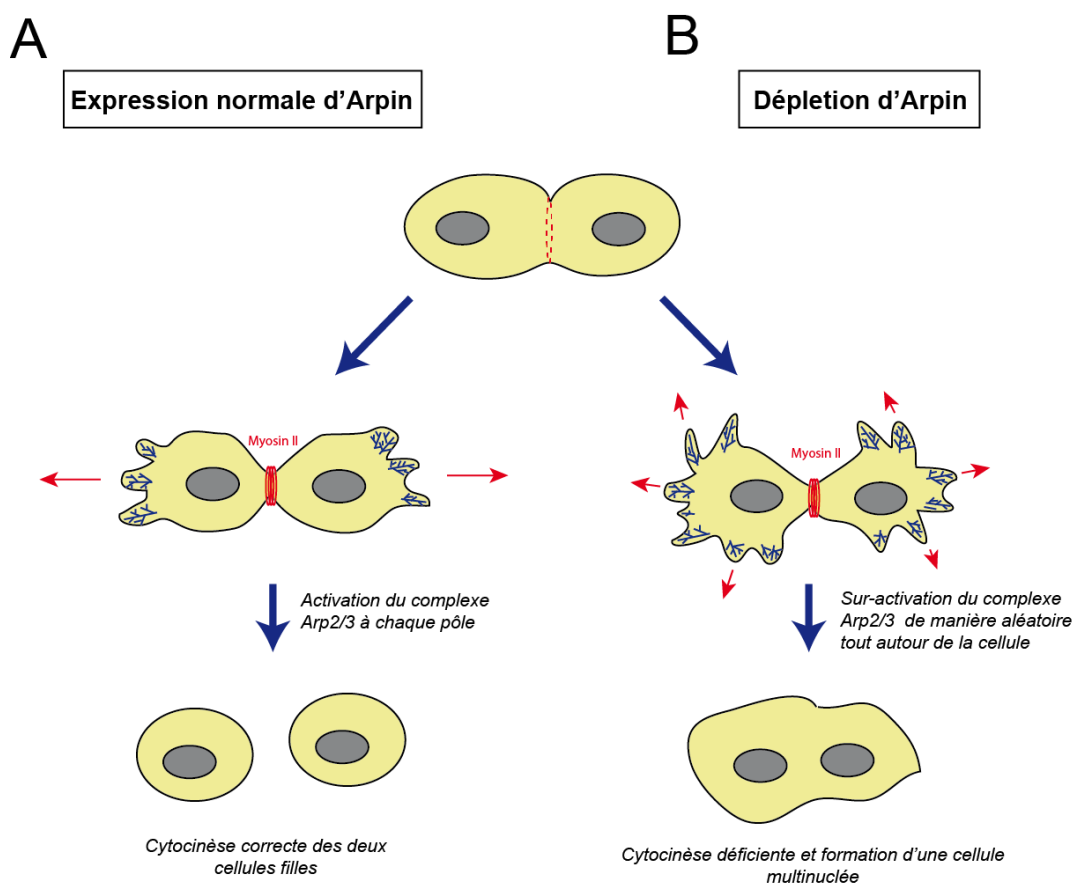
**Figure IV. Le point de contrôle du réseau d'actine branchée.** Un mécanisme permet à la cellule de sentir les réseaux d'actine branchés au lamellipode. Ce réseau est généré suite à l'activation de la petite GTPase Rac par les intégrines et les récepteurs à Tyrosine Kinase (RTK), qui activent le complexe WAVE, activant à son tour le complexe Arp2/3. Une fois le point de contrôle de l'assemblage correcte du réseau d'actine branché (BAC : branched actin checkpoint) satisfait, un signal d'activation est émis pour engager la cellule dans le cycle cellulaire. Extrait de (Dang and Gautreau, 2012).

D'autre part, Arpin pourrait aussi jouer un rôle au cours de l'étape de division cellulaire appelée cytokinèse. Lors de la mitose, les cellules eucaryotes se rétractent en inhibant l'activité du cytosquelette d'actine et s'arrondissent avant de se diviser en deux cellules filles suite à la formation d'un sillon équatorial qui implique la myosine II. Chez *Dictyostelium*, ce mécanisme est appelé cytokinèse A (dépendante de la myosine II). Il existe cependant d'autres mécanismes parallèles qui s'avèrent aussi nécessaires à la division cellulaire appelés cytokinèse B (indépendante de la myosine II, dépendante de l'adhésion) (Uyeda et al., 2000; Zang et al., 1997). Si l'un de ces mécanismes de cytokinèse est défaillant, une cellule multinuclée est produite. Le mécanisme de division indépendant de la myosine II n'est pas encore bien connu. Récemment, des études ont montré que la suractivation de la sous-unité WAVE chez *Dictyostelium*, induit la formation de cellules multinuclées (Caracino et al., 2007; Pollitt and Insall, 2008) soulignant l'importance de la régulation du réseau d'actine branchée au cours de la cytokinèse. En effet, suite à la formation du sillon équatorial, la cellule s'étale de part et d'autre du sillon par la formation de protrusion de type « ruffles » puis par des protrusions plus larges de type « lamellipodes » où la sous-unité WAVE est localisée (King et al., 2010) et qui contribue à la séparation des deux cellules filles par la génération de forces opposées (Figure V). En cas de suractivation de l'activité du complexe Arp2/3 par le complexe WAVE, les lamellipodes sont générés excessivement autour de la cellule et vont à l'encontre des forces opposées nécessaires à la cytokinèse.

Plusieurs observations au cours de ma thèse ont permis de renforcer le rôle d'Arpin dans la cytokinèse. En effet, on sait que la déplétion d'Arpin dans les cellules (MDA-MB-231, hTERT-RPE1,

*Dictyostelium discoideum*) favorise la formation des lamellipodes. Les cellules prolifèrent au même rythme que les cellules non déplétées cependant j'ai pu remarquer qu'elles étaient fréquemment multinuclées, signe d'un défaut de cytokinèse. Ces observations sont consistantes avec les publications citées ci-dessus qui montrent que l'augmentation de l'activité de WAVE produit des cellules multinuclées. Comme nous l'avons précisé précédemment, Arpin est impliquée dans l'« incoherent feedforward loop » qui contrôle la persistance des lamellipodes. Si Arpin est déplétée, la boucle de rétroaction positive impliquant le complexe WAVE est suractivée et de multiples lamellipodes sont formés de manière accrue et sont probablement responsables du défaut de cytokinèse (Figure V).

De ce fait, le contrôle de la polymérisation du réseau d'actine branché par Arpin, est donc essentiel au cours du cycle cellulaire que ce soit à l'entrée dans le cycle cellulaire par le point de contrôle BAC ou en phase finale de la mitose au cours de la cytokinèse. La perte d'expression d'Arpin dans les tumeurs invasives contribuerait, en plus de son implication dans la migration et l'invasion tumorale, à la prolifération excessive et incontrôlée des cellules tumorales.



**Figure V. Rôle putatif d'Arpin dans la cytokinèse.** **A**, Dans une cellule qui exprime un niveau normal d'Arpin, la cellule commence sa division par la formation du sillon équatorial qui implique la myosine II. Les protrusions de type lamellipodes sont générées de part et d'autre de la cellule en division et contribuent à la cytokinèse correcte en deux cellules filles. **B**, Dans la cellule déplétée en Arpin où la polymérisation d'actine branchée est accrue, les lamellipodes se forment de manière incontrôlée tout autour de la cellule. Les forces générées dans les différentes directions ne suffisent pas à séparer les deux cellules filles et aboutit à la formation d'une cellule multinuclée. Inspiré de (Pollitt and Insall, 2008).

---

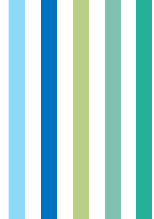
# Annexes



# **Evidence for a cell cycle checkpoint that senses branched actin in the lamellipodium.**

**Dang, I** & Gautreau, A. (2012) Bioessays

doi: 10.1002/bies.201200119. Epub 2012 Oct 19



# Evidence for a cell cycle checkpoint that senses branched actin in the lamellipodium

Irene Dang and Alexis Gautreau\*

## A possible checkpoint sensing correct actin polymerization

A fascinating paper by James Bear and colleagues has recently raised the possibility that branched actin networks, nucleated by the Arp2/3 complex, might be sensed by the cell and provide an essential signal for cell cycle progression in untransformed cells [1]. In this work, the authors knocked down the expression of the Arp2/3 complex in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. Knocked down cells did not proliferate, unless the tumor suppressor Arf was genetically inactivated. This important observation suggested that the Arp2/3 activity was not required per se, because it nucleates an essential cytoskeletal structure. Rather it suggested that branched actin networks were somehow sensed and that downstream an essential “go” signal was delivered to the cell cycle machinery (Fig. 1). The situation

appears analogous to the well-established “spindle assembly checkpoint” (SAC). SAC makes sure that all chromosomes are well attached to the aster microtubules at the metaphase stage of mitosis, before progressing to correct separation of chromosomes into the two daughter cells at the anaphase stage [2]. In cancer cells, where the SAC is not operative, cells do not stop in response to drugs depolymerizing microtubules. They also experience premature metaphase, which results in defects in chromosome segregation and aneuploidy.

Previous evidence suggested that actin filaments might be sensed like microtubules through a checkpoint. Cytochalasin drugs that impair actin polymerization stop the cell cycle [3–5]. This effect could be due to a requirement for the actin cytoskeleton to progress through mitosis, for example during constriction of the cleavage furrow, which is mediated by myosin motors walking on actin filaments. This cell cycle block, however, was observed even when very

low doses of cytochalasin, which had no visible effects on cleavage or adhesion, were used [5]. The cytochalasin-induced block occurred in G1, and this G1 block was alleviated when p53 or Rb tumor suppressors were inactivated [4, 5] (Table 1). Again such a rescue suggested a specific signaling pathway from the actin structure to cell cycle machineries rather than a general requirement for actin. Checkpoints are particular signaling pathways that inform the cell about specific cues, like correct cytoskeleton dynamics. In that sense, this putative signaling pathway that might monitor branched actin would qualify as a checkpoint.

## Which actin structure is sensed in the cell?

The new work by Bear and colleagues [1] adds to studies using cytochalasins to demonstrate that the proper dynamics of branched actin networks, which are nucleated by the Arp2/3 complex, are specifically sensed and required for cell cycle progression. The Arp2/3 complex is a molecular machine composed of seven subunits, two of which, actin-related protein 2 (Arp2) and actin-related protein 3 (Arp3), are related to actin itself. Arp2 and Arp3 are far apart in the resting machine. However, upon activation by so-called nucleation-promoting factors (NPFs), this machine undergoes a conformational rearrangement that brings together Arp2 and Arp3 so as to mimic the extremity of an actin filament, which

### Keywords:

■ Arp2/3 complex; cell migration; proliferation; tumor suppressor; WAVE complex

DOI 10.1002/bies.201200119

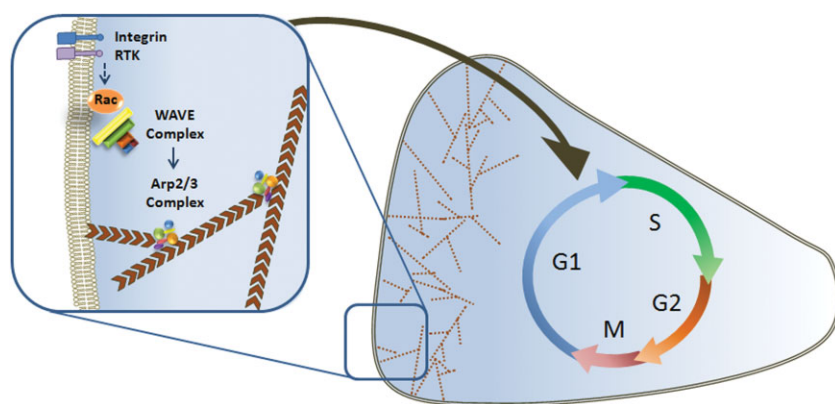
Centre de Recherche de Gif, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, UPR3082, Gif-sur-Yvette, France

### \*Corresponding author:

Alexis Gautreau  
E-mail: alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr

### Abbreviations:

**Arp**, actin-related protein; **ECM**, extracellular matrix; **MEF**, mouse embryonic fibroblast; **NPF**, nucleation-promoting factor; **RTK**, receptor tyrosine kinase; **SRF**, serum responsive factor.



**Figure 1.** The branched actin checkpoint. The cell senses the presence of the branched actin network in its lamellipodium (by unknown mechanisms). We hypothesize that branched actin would then signal cell cycle progression through G1. In lamellipodia of untransformed cells, the Arp2/3 complex is activated by the Rac-WAVE pathway. It is well established that the Rac-WAVE pathway is activated by integrin-mediated adhesion and receptor tyrosine kinases (RTK).

is a double helix. This activation process is associated with an interaction between the Arp2/3 complex and a pre-existing filament in such a way that the rearranged Arp2/3 complex allows the elongation of an actin filament branching off a pre-existing filament [6]. This striking autocatalytic process, where the newly formed actin filament can provide the substrate for a new branching reaction, results in the formation of dense actin networks. These branched actin networks can provide a scaffold onto which signaling molecules are recruited. They also generate a force, which might also generate signals.

The force generated by the polymerization of branched actin networks is

used in the cell to propel or to remodel membranes. Two NPFs, WAVE and N-WASP, illustrate these two broad functions ascribed to Arp2/3 complex activity. WAVE is well known to be required for the formation of membrane protrusions called lamellipodia. The Arp2/3 complex was also proposed to be required for the formation of lamellipodia. However, this function had been disputed. The recent paper by Bear's group and another one by the group of Rong Li now unambiguously establish the role of the Arp2/3 complex in lamellipodium formation [1, 7]. In contrast, the N-WASP NPF induces the formation of branched actin networks at invaginations of the plasma membrane, the clathrin-coated

pits. Branched actin networks at the clathrin-coated pit appear to have an important role in “pinching off” the plasma membrane to generate endosomes [8]. The WASH NPF induces branched actin networks at the surface of endosomes. These branched actin networks also control fission of transport intermediates emanating from endosomes [8]. Although some redundancy might exist, it is generally believed that the different families of NPFs divide the labor of activating the Arp2/3 complex at different subcellular locations.

So, which one of these NPFs provides the branched actin structure that is sensed for cell cycle progression? Knock-out MEFs have been generated for WAVE2 (the ubiquitously expressed WAVE protein), N-WASP, and WASH. MEFs deficient in WAVE2 have a strong proliferation defect [9], but no proliferation defect has been observed in MEFs deficient in WASH [10]. For N-WASP, the situation is more complex. A proliferation defect has been reported when MEFs were isolated from sick N-WASP-deficient embryos that die a couple of days later [11]. However, when MEFs were isolated from healthy embryos carrying floxed N-WASP alleles, no proliferation defect was observed upon excision of the two alleles [12]. So N-WASP is in fact dispensable for cell cycle progression. Together, these observations suggest that the WAVE pathway, which is responsible for lamellipodium formation, is the most important for the branched actin checkpoint. In other words, branched actin from lamellipodia, but not from endocytic pits or endosomes, seems to be sensed and to deliver the “go” signal to the cell cycle machinery.

**Table 1.** Cell proliferation in response to various treatments affecting actin polymerization

Treatment	Cells	Proliferation	Refs.
Cytochalasin	MEF, 3T3, REF	–	[3–5]
Cytochalasin + p53 inactivated	REF	+	[4]
Cytochalasin + RB KO	MEF	+	[5]
Cytochalasin	Transformed 3T3	+	[3]
Arp2/3 KD	MEF	–	[1]
Arp2/3 KD + Arf KO	MEF	+	[1]
WAVE2 KO	MEF	–	[9]
WAVE2 KO	ES	+	[9]
N-WASP KO	MEF	+	[12]
WASH KO	MEF	+	[10]

ES, mouse embryonic stem cells; KO, knock-out, KD, knock-down; MEF, mouse embryonic fibroblast; REF, rat embryonic fibroblast.

## Potential mechanisms of actin sensing

How can a cell sense structures like branched actin networks? And specifically those present at lamellipodia? A well-established signaling pathway that senses the actin status is that of the serum responsive factor (SRF), a transcription factor that controls the expression of many mitogen-responsive genes. SRF is activated by cell treatments that activate actin polymerization. The

mechanism involves proteins of the MAL family of transcriptional coactivators, which associate with SRF only when activated. The activity of MAL is repressed by the interaction with globular actin (G-actin). When actin polymerizes, the concentration of G-actin drops and MAL becomes free to interact with SRF [13]. Rho GTPases are well-known activators of the SRF pathway. However, the most active GTPase in that respect is neither Rac nor Cdc42, which both induce Arp2/3 activation, but RhoA [14]. The RhoA pathway induces actin polymerization through the activation of formins that polymerize linear arrays of actin filaments. Thus the SRF pathway is unlikely to mediate the branched actin checkpoint.

Lamellipodia are triggered by the activation of the small GTPase Rac, which activates the WAVE complex [15]. Sensing of lamellipodial actin has been postulated in a recent model of chemotaxis [16]. Persistent directional migration would be maintained through a positive feedback loop that activates Rac, whereas a branched actin network was previously generated, and chemotaxis would then be simply a modulation of this robust positive feedback loop that maintains migration direction. This positive feedback loop model recently received strong biochemical support with the identification of Coronin1A [17]. Molecules of the Coronin1 family are lamellipodial proteins that recognize the branched actin junction and debranch it [18]. Coronin1A drives Rac translocation and associates with an exchange factor, which activates Rac at lamellipodia [17]. The attractive hypothesis that the lamellipodial branched actin network can thus be sensed by coronin1 in the branched actin checkpoint should be tested. Further dissection of the migration positive feedback loop could provide more candidate molecules to test for their implication in signaling the branched actin checkpoint.

## Signaling pathways that satisfy the WAVE-Arp2/3-actin checkpoint

Numerous growth factors, in particular the ones activating receptor tyrosine kinases (RTKs), activate Rac, and hence

the WAVE-Arp2/3 pathway, and should satisfy the branched actin checkpoint. Consistent with our checkpoint hypothesis, RTKs activate cell cycle progression in addition to inducing the formation of lamellipodia. Integrin signaling collaborates with RTK signaling and is as important as RTK signaling for cell cycle progression [19, 20]. Integrin signaling provides Rac activation by triggering its translocation to the plasma membrane, where it can connect with its effectors, including the WAVE complex [21]. The requirement for integrin signaling explains why cells need to spread beyond a certain surface area in order to progress through the cell cycle, as shown on adhesive micropatterns of different sizes [22]. The combination of signals from integrins and RTKs thus satisfies the branched actin checkpoint in the spread fibroblast. Reciprocally, induction of lamellipodia through the Rac-WAVE-Arp2/3 pathway promotes the radial organization of nascent focal adhesions [1] and so this pathway promotes efficient spreading along the extracellular matrix (ECM). Integrins are thus both upstream and downstream of Arp2/3 in a positive feedback loop.

In epithelial cells, the same Rac-WAVE-Arp2/3 pathway has been shown to be critical for cadherin-dependent formation of cell–cell junctions [23, 24]. Initially, small lamellipodia-like structures promote the expansion of the contact zone between initial cell–cell adhesion points. Later the pathway is required for the maintenance of cell–cell junctions. The same Rac-WAVE-Arp2/3 pathway might thus be as important for cell cycle progression in epithelial cells that depend on their interaction with neighboring cells as it is in fibroblasts that depend on ECM adhesion and cell spreading.

## Do cancer cells lose the branched actin checkpoint?

A checkpoint must provide a useful pathway for the untransformed cell. We have seen that the branched actin checkpoint is ideally suited to instruct cells of their correct interaction with the environment. But loss of a checkpoint may convey an advantage on cancer

cells by relieving a block on proliferation. Indeed, transformed cells do not stop in response to actin depolymerizing drugs [3]. Similarly, knock-out of WAVE2 [9] or of the Arp2/3 subunit ArpC3 [7] does not lead to defective proliferation of mouse ES cells, which express the oncogene ERas [25].

“Anchorage-independent growth” is one of the best *in vitro* criteria to identify the cells that form tumors *in vivo*, the definition of transformed cells. Transformed fibroblasts (sarcoma) are able to proliferate without ECM adhesion and transformed epithelial cells (carcinoma) are able to proliferate without cell–cell adhesion. These characteristics immediately appear as a possible alteration of the branched actin checkpoint. If alteration of the branched actin checkpoint allows cells to escape the controls exerted by their environment, it is possible that it also allows cells to escape the normal protrusion-based mode of cell migration. Indeed, tumor cells appear protean with respect to migration and invasion structures, using alternatively invadopodia, blebs, uropods, or microtubule-based protrusions [26–28]. In the recent first “World Cell Race”, to which participants sent their favorite cells or cell lines, the winners were untransformed cells, even though invasive transformed (i.e. metastatic) cells were well represented on the assumption that they would migrate faster [29]. It is thus likely that cancer cells, having lost the branched actin checkpoint, also escape the stereotypical and efficient mode of migration of untransformed cells that is based on lamellipodia and integrin positive feedback loops, where the cell checks as it moves that it migrates along ECM tracks.

We believe that the pathway that senses branched actin and signals to the cell cycle has the required properties to qualify as a checkpoint. The branched actin checkpoint provides a conceptual framework that facilitates the incorporation of many seminal observations on cell cycle progression, such as the role of RTKs and cell adhesion, together with recent ones, like the requirement for the Arp2/3 complex. Several tumor suppressor proteins, such as p53 [4], Rb [5], p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [30], are induced when actin polymerization is impaired. These read-outs will allow the dissection

of the branched actin checkpoint in untransformed cells. The branched actin checkpoint appears central for cell transformation. It should be straightforward to test its importance by examining cell cycle progression in both transformed and untransformed cells upon exposure to drugs that alter actin polymerization or Arp2/3 activity. The mechanisms by which transformed cells impair this signaling pathway should provide useful hints as to how cancer cells escape from the controls exerted by their environment.

### Acknowledgments

Work in our laboratory is funded by Agence Nationale pour la Recherche and Association pour la Recherche sur le Cancer. We wish to thank Ksenia Oguievetskaia, Christien Merrifield and Antonina Alexandrova for helpful comments on the manuscript. We apologize to the authors whose work was not cited due to space limitations.

### References

1. Wu C, Asokan SB, Berginski ME, Haynes EM, et al. 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* **148**: 973–87.
2. Musacchio A. 2011. Spindle assembly checkpoint: The third decade. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 3595–604.
3. Maness PF, Walsh RC, Jr. 1982. Dihydrocytochalasin B disorganizes actin cytoarchitecture and inhibits initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* **30**: 253–62.
4. Rubtsova SN, Kondratov RV, Kopnin PB, Chumakov PM, et al. 1998. Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett* **430**: 353–7.
5. Lohez OD, Reynaud C, Borel F, Andreassen PR, et al. 2003. Arrest of mammalian fibroblasts in G1 in response to actin inhibition is dependent on retinoblastoma pocket proteins but not on p53. *J Cell Biol* **161**: 67–77.
6. Pollard TD. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 451–77.
7. Suraneni P, Rubinstein B, Unruh JR, Durnin M, et al. 2012. The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J Cell Biol* **197**: 239–51.
8. Suetsugu S, Gautreau A. 2012. Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends Cell Biol* **22**: 141–50.
9. Yan C, Martinez-Quiles N, Eden S, Shibata T, et al. 2003. WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *EMBO J* **22**: 3602–12.
10. Gomez TS, Gorman JA, Artal-Martinez de Narvajias A, Koenig AO, et al. 2012. Trafficking defects in WASH knockout fibroblasts originate from collapsed endosomal and lysosomal networks. *Mol Biol Cell* **23**: 3215–28.
11. Snapper SB, Takeshima F, Anton I, Liu CH, et al. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol* **3**: 897–904.
12. Lommel S, Benesch S, Rottner K, Franz T, et al. 2001. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep* **2**: 850–7.
13. Posern G, Treisman R. 2006. Actin' together: Serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* **16**: 588–96.
14. Grosse R, Copeland JW, Newsome TP, Way M, et al. 2003. A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *EMBO J* **22**: 3050–61.
15. Derivery E, Gautreau A. 2010. Generation of branched actin networks: Assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* **32**: 119–31.
16. Neilson MP, Veltman DM, van Haastert PJ, Webb SD, et al. 2011. Chemotaxis: A feedback-based computational model robustly predicts multiple aspects of real cell behaviour. *PLoS Biol* **9**: e1000618.
17. Castro-Castro A, Ojeda V, Barreira M, Sauzeau V, et al. 2011. Coronin 1A promotes a cytoskeletal-based feedback loop that facilitates Rac1 translocation and activation. *EMBO J* **30**: 3913–27.
18. Cai L, Makhov AM, Schafer DA, Bear JE. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell* **134**: 828–42.
19. Assoian RK, Schwartz MA. 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 48–53.
20. Mettouchi A, Klein S, Guo W, Lopez-Lago M, et al. 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* **8**: 115–27.
21. Del Pozo MA, Schwartz MA. 2007. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* **17**: 246–50.
22. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, et al. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* **276**: 1425–8.
23. Verma S, Shewan AM, Scott JA, Helwani FM, et al. 2004. Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J Biol Chem* **279**: 34062–70.
24. Yamazaki D, Oikawa T, Takenawa T. 2007. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci* **120**: 86–100.
25. Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. 2003. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* **423**: 541–5.
26. Ridley AJ. 2011. Life at the leading edge. *Cell* **145**: 1012–22.
27. Poincloux R, Collin O, Lizarraga F, Romao M, et al. 2011. Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 1943–8.
28. Panopoulos A, Howell M, Fotedar R, Margolis RL. 2011. Glioblastoma motility occurs in the absence of actin polymer. *Mol Biol Cell* **22**: 2212–20.
29. Maiuri P, Terriac E, Paul-Gilloteaux P, Vignaud T, et al. 2012. The first World Cell Race. *Curr Biol* **22**: R673–5.
30. Lee YJ, Tsai CH, Hwang JJ, Chiu SJ, et al. 2009. Involvement of a p53-independent and post-transcriptional up-regulation for p21WAF/CIP1 following destabilization of the actin cytoskeleton. *Int J Oncol* **34**: 581–9.

# **A novel inhibitor of the Arp2/3 complex, Arpin, controls cell migration**

Gorelik R<sup>1</sup>, **Dang I**, Gautreau A. (2014) *Medecine Sciences*

doi: 10.1051/medsci/20143003010. Epub 2014 Mar 31



souvenirs d'EMI se sont révélés être plus saillants émotionnellement et possédant un contenu autoréférentiel plus riche (Figure 1).

En outre, la valeur émotionnelle d'une EMI pourrait expliquer la plus grande quantité de détails mémorisés. L'intensité émotionnelle augmente la quantité d'informations sensorielles rapportées dans les souvenirs d'événements très prégnants. Il en résulte une meilleure réactivation (en interne et/ou en externe lorsque ces souvenirs sont partagés avec d'autres personnes) aboutissant à leur donner plus d'importance et à augmenter leur niveau de disponibilité [8]. De plus, il est probable que la nature autoréférentielle de l'EMI favorise la récupération des détails qui lui sont associés [9]. Ainsi, en combinant les caractères émotionnel et autoréférentiel, les EMI pourraient ainsi devenir des « *self-defining memories* », favorisant ainsi la récupération des détails en mémoire.

D'autre part, une hypothèse a été émise, selon laquelle les EMI pourraient être le produit d'un faux souvenir ou d'une hallucination. L'événement à l'origine de ces expériences n'aurait pas été vécu dans la réalité (la personne n'est

pas réellement sortie de son corps), mais plutôt subjectivement en raison d'une modification du fonctionnement cérébral, ce qui conduirait à un souvenir illusoire. Ces types de souvenirs peuvent être très détaillés et il a été démontré que dans un contexte émotionnellement saillant et lié à la survie de l'individu, on observait une augmentation de la reconstruction de souvenirs [10], ce qui pourrait être le cas dans les souvenirs d'EMI. ♦

### Can the phenomenology of near death experiences memories be compared to memories of real and imagined events?

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a reçu le soutien financier du Fonds national de la recherche scientifique (FRS-FNRS), de l'université de Liège et de l'hôpital universitaire de Liège, de la Commission européenne (projets Mindbridge, COST, CATIA, DECODER et DISCOS), de la fondation James S. McDonnell, de la fondation Mind Science, de la Communauté francophone d'actions de recherche concertées (ARC 06/11-340), de la Fondation d'utilité publique « Université

européenne du travail », de la « *Fondazione Europea di ricerca biomedica* » et de la *Fondation médicale Reine Elisabeth* ainsi que des fonds Léon Fredericq.

#### RÉFÉRENCES

1. Kellehear A. Culture, biology, and the near-death experience. A reappraisal. *J Nerv Mental Dis* 1993 ; 181 : 148-56.
2. Blanke O, Dieguez S. Leaving body and life behind: out-of-body and near-death experiences. In : Laureys S, Tononi G, eds. *The neurology of consciousness: cognitive neuroscience and neuropathology*. London : Academic Press-Elsevier Ltd, 2009 : 303-25.
3. Blackmore, S. *Dying to live: science and near-death experience*. London : Grafton, 1993.
4. French CC. Dying to know the truth: visions of a dying brain, or false memories? *Lancet* 2001 ; 358 : 2010-1.
5. Johnson MK, Foley MA, Suengas AG, Raye CL. Phenomenal characteristics of memories for perceived and imagined autobiographical events. *J Exp Psychol* 1988 ; 117 : 371-6.
6. Thonnard M, Charland-Verville V, Bredart S, et al. Characteristics of near-death experiences memories as compared to real and imagined events memories. *PLoS One* 2013 ; 8 : e57620.
7. Potts, M. The evidential value of near-death experiences for belief in life after death. *J Near-Death Studies* 2002 ; 20 : 233-5.
8. Schaefer A, Philippot P. Selective effects of emotion on the phenomenal characteristics of autobiographical memories. *Memory* 2005 ; 13 : 148-60.
9. Conway MA, Dewhurst SA. Remembering, familiarity, and source monitoring. *Q J Exp Psychol B* 1995 ; 48 : 125-40.
10. Dehon, H. Illusory recollection: the compelling subjective remembrance of things that never happened. Insights from the DRM paradigm (special issue in honor of Géry d'Ydewalle). *Psychologica Belgica* 2012 ; 52 (suppl) : 121-49.

## NOUVELLE

### Arpin, un nouvel inhibiteur du complexe Arp2/3, contrôle la migration cellulaire

Roman Gorelik, Irène Dang, Alexis Gautreau

Laboratoire d'enzymologie et de biochimie structurales, CNRS UPR3082, Bâtiment 34, avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.  
[alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr)

#### La protrusion de la membrane plasmique dépend de la formation de réseaux d'actine branchée

Les cellules qui migrent sont polarisées. Au front de migration, la membrane plasmique s'étale sur le substrat dans une structure appelée lamellipode. La protrusion du lamellipode est due à la force

générée par la polymérisation d'une protéine fibreuse, l'actine. Au lamellipode, les réseaux d'actine sont branchés, et ce, grâce à une machine moléculaire, appelée complexe Arp2/3 [1]. Cette machine est activée à l'extrémité du lamellipode par la molécule Wave. Cet activateur, comme les autres activateurs

du complexe Arp2/3, contient une extrémité carboxy-terminale comprenant un motif WH2 interagissant avec l'actine, et un motif acide interagissant avec le complexe Arp2/3 [2]. Ces deux motifs sont absolument essentiels à l'activation du complexe Arp2/3. Wave est lui-même un composant d'une autre machine



moléculaire, le complexe Wave, qui contient aussi une sous-unité effectrice de l'interrupteur moléculaire, Rac [3]. Rac est une petite GTPase qui déclenche la formation des lamellipodes sous sa forme active liée au GTP. Cette voie de signalisation qui aboutit à la polymérisation d'actine, donc à la génération de force et ainsi à la protrusion membranaire est particulièrement bien comprise (Figure 1).

Cependant la migration cellulaire est finement régulée en termes de vitesse et de direction. Et cette unique voie de signalisation nous semblait insuffisante pour rendre compte de ces régulations. Nous avons donc décidé de chercher s'il existait de nouvelles protéines régulant le moteur de la protrusion membranaire, le complexe Arp2/3.

### Identification d'une nouvelle molécule qui inhibe le complexe Arp2/3 *in vitro*

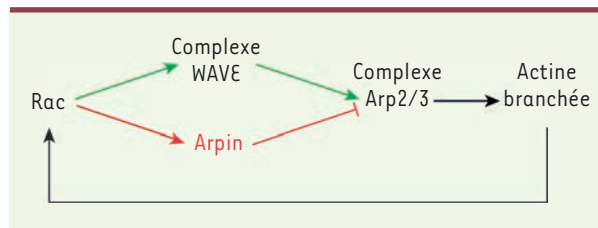
Nous avons écrit un programme qui recherchait dans les bases de données toutes les protéines contenant un motif acide à leur extrémité carboxy-terminale. Ce programme a permis d'identifier une protéine qui n'était pas caractérisée comme un activateur connu du complexe Arp2/3. Cette protéine ne possède pas le motif WH2, essentiel lui aussi à l'activation du complexe Arp2/3. J'ai appelé cette protéine Arpin en hommage à ma directrice de thèse, Monique Arpin.

Dans des tests *in vitro* de polymérisation d'actine et de formation de réseaux branchés, Arpin est apparue comme inhibant le complexe Arp2/3, ce qui était cohérent avec l'absence de motif WH2. En fait, Arpin est un inhibiteur compétitif de l'activateur grâce à son motif acide. « Arpin » s'est donc avéré un nom mnémotechnique de l'activité de la protéine : Arp2/3 inhibition... Mais dans la cellule, le complexe Arp2/3 exerce différentes fonctions au niveau de la membrane plasmique ou de différents compartiments intracellulaires. Nous avons donc ensuite cherché à caractériser dans quel site cellulaire Arpin exerce sa fonction inhibitrice.

### Arpin inhibe localement la protrusion des lamellipodes

Nous avons localisé Arpin à l'extrémité du lamellipode, suggérant que la protéine joue un rôle dans la migration cellulaire. Il était cependant surprenant de trouver un inhibiteur de la polymérisation d'actine exactement là où l'actine est polymérisée ! Nous avons donc cherché à déterminer si l'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3 dépendait de Rac ; effectivement, Arpin perd son interaction avec Arp2/3 dans des cellules dépourvues (*knock-out*) de Rac qui sont incapables de générer des lamellipodes [4]. Finalement, nous avons inhibé par interférence ARN l'expression d'Arpin dans les cellules et observé que les lamellipodes progressaient alors plus vite, ce qui confirme le rôle inhibiteur d'Arpin localisé à l'extrémité du lamellipode.

Intuitivement, on anticipe une signalisation activatrice locale associée à une inhibition globale de la polymérisation d'actine pour que se forme un lamellipode à l'avant de la cellule. Cependant, nos résultats indiquent de manière non ambiguë qu'Arpin est un inhibiteur local du complexe Arp2/3. De manière surprenante, Rac, qui déclenche la formation des lamellipodes grâce à l'activation d'Arp2/3 par Wave, déclenche aussi l'inhibition d'Arp2/3 par Arpin. Un tel circuit est qualifié d'*incoherent feedforward loop*. Ce n'est pas une rétroaction, parce qu'il y a deux voies pour aller de l'avant, de Rac à Arp2/3 (Figure 1), mais ces voies sont incohérentes en ce qu'elles délivrent des signaux contradictoires. En fait, ce type de circuit paradoxal est répandu dans les réseaux de transcription, où il régule la temporalité de la réponse [5]. Typiquement, il produit



**Figure 1. Circuit de signalisation de la polymérisation d'actine branchée au lamellipode.** En aval de Rac, il existe une voie activatrice d'Arp2/3 qui passe par Wave et une voie inhibitrice qui passe par Arpin. Ces deux voies contradictoires génèrent une *incoherent feedforward loop*. Quand la migration est efficace, le lamellipode à l'avant de la cellule est maintenu au cours du temps grâce à une *feedback loop* qui détecte l'actine branchée et qui active Rac en réponse.

une réponse transitoire, une courbe « en cloche », en réponse à une stimulation. Mais est-ce que ce circuit est important pour la migration cellulaire ?

### Arpin est le frein et le volant de la migration cellulaire

Nous avons examiné des embryons de poisson zèbre, dans lesquels nous avions marqué les cellules de la plaque préchordale qui migrent de manière concertée lors de la gastrulation. En l'absence d'Arpin, ces cellules migrent d'une manière moins ordonnée. La greffe des cellules de la plaque préchordale dépourvues d'Arpin chez un embryon receveur sauvage a permis de montrer que les protrusions de ces cellules sont présentes plus longtemps, en accord avec l'hypothèse d'une régulation de la temporalité de la réponse par Arpin. De plus, cette expérience révélait un défaut des cellules en migration, qui n'était pas détecté dans les autres cellules de l'embryon. Ce défaut, qui est intrinsèque à la cellule, justifie une étude détaillée des paramètres de migration qu'Arpin contrôle dans des cultures de cellules isolées.

Lorsque nous avons inactivé l'expression d'Arpin par ARN interférence dans des cellules de mammifère ou par *knock-out* dans l'amibe *Dictyostelium*, nous avons observé les mêmes conséquences : les cellules migraient plus vite et suivent une trajectoire plus rectiligne. Pour



analyser les conséquences de la réintroduction de l'activité d'Arpin, nous avons donc sélectionné le modèle cellulaire le plus rapide et le plus stable dans sa direction, le kératocyte de poisson. Nous avons micro-injecté ces cellules primaires avec de l'Arpin recombinante. En réponse à l'introduction d'Arpin, des lamellipodes continuent à se former, mais ils deviennent extrêmement instables. Par conséquent, les kératocytes ralentissent et changent de direction, puisque le lamellipode est la structure qui définit l'avant de la cellule.

Le maintien d'une direction donnée au cours du temps dépend d'une boucle rétroactive qui détecte où les réseaux d'actine branchés sont générés et, en réponse, active localement Rac [6, 7]. Dans le kératocyte intervient donc probablement une signalisation par rétroaction positive dynamique qui permet une migration efficace, à la fois dans sa vitesse et sa direction. Quand Arpin est injectée, cette boucle régulatrice peut bifurquer, en aval de Rac, sur la voie Arpin qui s'oppose à cet effet rétroactif positif passant par Wave (Figure 2). Ce circuit complexe permet de prédire que quand la boucle de rétroaction rencontre l'*incoherent feedforward loop* (voir plus haut), des courbes en cloches successives sont générées [8, 9]. Et effectivement, des oscillations du lamellipode - successions périodiques de protrusions suivies de rétraction - ont été détectées dans les kératocytes injectés avec de l'Arpin.

Arpin est donc un régulateur de la migration cellulaire : cette molécule ne fait pas partie de la machinerie motrice requise pour la migration, mais c'est un inhibiteur puissant de la migration cellulaire, qui diminue vitesse et direction, les deux paramètres majeurs qui déterminent l'efficacité de la migration [10]. Nous nous attendons à ce qu'Arpin soit impliquée dans de nombreux processus physiologiques dans lesquels intervient une migration

fine de la migration cellulaire. En ce qui concerne la pathologie, des expériences préliminaires montrent une perte de l'expression d'Arpin dans les cancers du sein les plus invasifs, associée à la formation de métastases et à une moindre survie des patientes. Nous cherchons donc maintenant à caractériser les mécanismes par lesquels les cellules tumorales perdent l'expression d'Arpin. ♦

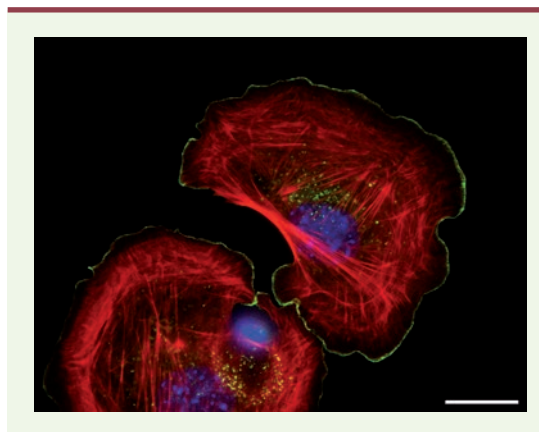
### A novel inhibitor of the Arp2/3 complex, Arpin, controls cell migration

#### LIENS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011 ; 145 : 1012-22.



**Figure 2. Localisation d'Arpin à l'extrémité du lamellipode.** Localisation de l'Arpin (vert), de l'actine polymérisée (rouge) et des noyaux (bleus) dans des fibroblastes embryonnaires murins par immunofluorescence. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

2. Pollard TD. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007 ; 36 : 451-77.
3. Derivery E, Gautreau A. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *Bioessays* 2010 ; 32 : 119-31.
4. Steffen A, Ladwein M, Dimchev GA, et al. Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J Cell Sci* 2013 ; 126 : 4572-88.
5. Hart Y, Alon U. The utility of paradoxical components in biological circuits. *Mol Cell* 2013 ; 49 : 213-21.
6. Neilson MP, Neilson MP, Veltman DM, et al. Chemotaxis: a feedback-based computational model robustly predicts multiple aspects of real cell behaviour. *PLoS Biol* 2011 ; 9 : e1000618.
7. Castro-Castro A, Ojeda V, Barreira MIA, et al. Coronin 1A promotes a cytoskeletal-based feedback loop that facilitates Rac1 translocation and activation. *EMBO J* 2011 ; 30 : 3913-27.
8. Allard J, Mogilner A. Traveling waves in actin dynamics and cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 2013 ; 25 : 107-15.
9. Brandman O, Brandman O, Meyer T, et al. Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* 2008 ; 322 : 390-5.
10. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 ; 10 : 538-49.

# MiRNA let-7g regulates skeletal myoblast motility via Pinch-2.

Boudoukha S., *et al* (2014) *FEBS Letter*

doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.057. Epub 2014 Mar 5.

S.Boudoukha<sup>1,2,3</sup>, T.Rivera Vargas<sup>1,2</sup>, **I.Dang**<sup>4</sup>, J.Kropp<sup>1,2</sup>, S.Cuvelliere<sup>5</sup>, A.Gautreau<sup>4</sup>, A.Polesskaya<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>CNRS FRE 3377, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.<sup>2</sup>Univ Paris-Sud, FRE 3377, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA, USA.<sup>4</sup>Centre de Recherche de Gif, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS UPR3082, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.<sup>5</sup>Inserm U1016, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS 8104, Université Paris Descartes, F-75014 Paris, France

## Contribution:

Au cours de cette étude, j'ai effectué les tests de migrations en 2D des cellules C2C12 déplétées par siRNA PINCH-2 ou l'inhibiteur let-7g (Figure 4). J'ai suivi les trajectoires des cellules et quantifié les vitesses de migration et la directionnalité des cellules.



## MiRNA let-7g regulates skeletal myoblast motility via Pinch-2



S. Boudoukha<sup>a,b,c</sup>, T. Rivera Vargas<sup>a,b</sup>, I. Dang<sup>d</sup>, J. Kropp<sup>a,b</sup>, S. Cuvellier<sup>e</sup>, A. Gautreau<sup>d</sup>, A. Polesskaya<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS FRE 3377, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>b</sup> Univ Paris-Sud, FRE 3377, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA, USA

<sup>d</sup> Centre de Recherche de Gif, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS UPR3082, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

<sup>e</sup> Inserm U1016, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS 8104, Université Paris Descartes, F-75014 Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 December 2013

Revised 20 February 2014

Accepted 21 February 2014

Available online 5 March 2014

Edited by Tamas Dalmay

#### Keywords:

Cell motility

Cell adhesion

microRNA

RNA-binding protein

Skeletal muscle

PINCH-2

Let-7g

### ABSTRACT

**Post-transcriptional regulation of gene expression by RNA-binding proteins and by small non-coding RNAs plays an important role in cell biology. Our previous results show that in murine skeletal myoblasts, the expression of Pinch-2, a focal adhesion remodeling factor that regulates cell motility, is repressed by an RNA-binding protein IMP-2/Igf2bp2. We now show that the expression of Pinch-2 is also regulated by the miRNA let-7g. Let-7g and IMP-2 repress Pinch-2 expression independently of each other. A knock-down of let-7g leads to an increase in Pinch-2 expression, and to a decrease of cell motility, which can be reversed by a simultaneous knock-down of Pinch-2. We conclude that let-7g controls the motility of mouse myoblasts in cell culture by post-transcriptionally regulating the expression of Pinch-2.**

© 2014 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Post-transcriptional regulation of gene expression depends on multiple and complex mechanisms that fine-tune the levels of protein synthesis from specific mRNA transcripts. The main regulatory factors of post-transcriptional regulation are various RNA-binding proteins, as well as small non-coding RNAs, such as microRNAs (miRNAs). Some of the best-characterized examples of such regulation by RNA-binding proteins include the studies of the IMP/Igf2bp1-3 (Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA-binding proteins 1, 2, and 3) family and its mRNA targets [1], reviewed in [2]. Thus, IMP-1/ZBP-1 (zipcode-binding protein 1) binds to a group of mRNAs coding for key regulatory factors for cellular motility and adhesion ( $\beta$ -actin, the Arp2/3 complex,  $\alpha$ -actinin, E-cadherin) [3]. The functions of IMP-1 in human cancer cells include stabilization of focal adhesions and maintenance of the cellular capacity for directional motility [4]. Other studies have also shown a link between cellular motility, cellular adhesion, and the expression of members of IMP family [5].

Focal adhesions (FAs) are large protein complexes that directly regulate cell anchorage and cell motility, and also have an important impact on cell proliferation, stress response and signal transduction (reviewed in [6]). These structures are highly dynamic and can rapidly disassemble and reassemble following an interaction with numerous FA regulatory proteins. Pinch-2 protein can interact with the FAs and induce their remodeling in human and mouse cells, and an overexpression of Pinch-2 leads to dramatic changes in cell spreading and cell motility [7,8]. Thus, the expression levels of Pinch-2 have to be regulated by the cell in order to ensure a normal functioning. The migration capacity of myoblasts is particularly important in skeletal muscle development and maintenance, where the cells frequently have to undergo directed, long-range migration in order to form new muscle, or to regenerate the damaged muscle tissue (reviewed in [9]). We have earlier shown that the expression of Pinch-2 is very efficiently regulated at the post-transcriptional level by an RNA-binding protein IMP-2/Igf2bp2 in mouse and human muscle cells [10]. In the current study, we are describing another post-transcriptional regulatory mechanism that controls Pinch-2 expression in mouse myoblasts.

We now show that the expression of Pinch-2 depends on Argonaute 2 (Ago-2), a key regulatory protein in RNA interference (RNAi), indicating that Pinch-2 mRNA can be a target of RNAi in

\* Corresponding author at: CNRS FRE 3377, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.

E-mail address: [anna.polesskaya@cea.fr](mailto:anna.polesskaya@cea.fr) (A. Polesskaya).

mouse myoblasts. Indeed, we find that in addition to IMP-2, the expression of Pinch-2 is repressed by the microRNA (miRNA) let-7g-5p (further referred to as let-7g). Let-7g belongs to one of the most widely and abundantly expressed, conserved, and functionally important miRNA families known to date (reviewed in [11,12]). In human, this family consists of ten highly similar miRNAs (let-7a to i, miR-98 and miR-202) that share the same seed sequence, and in most cases were shown to target the same mRNAs and to have redundant functions (reviewed in [11]).

We show that the 3'UTR of Pinch-2 mRNA has four functionally important sites for let-7g. A knock-down (KD) of let-7g or of IMP-2 significantly increased Pinch-2 mRNA and protein levels, and a simultaneous KD of let-7g and IMP-2 led to an additional increase of Pinch-2, suggesting that the repression by IMP-2 and let-7g occurs by two independent mechanisms. Finally, we show that let-7g is important for the motility of mouse myoblasts, and that this function of let-7g depends on Pinch-2 expression levels.

## 2. Results

### 2.1. Expression of Pinch-2 in mouse myoblasts is suppressed by Ago-2 protein

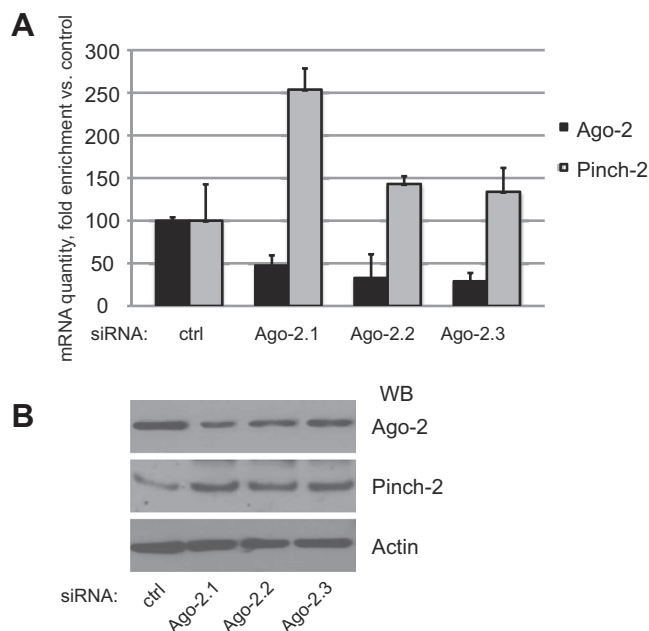
To characterize the mechanisms of Pinch-2 post-transcriptional regulation in mouse myoblasts C2C12, we have decreased the expression of key RNAi regulatory protein Ago-2 by three different siRNAs and analyzed the expression of Pinch-2 mRNA and protein. In mammalian cells, Ago-2 is known to be recruited to the target mRNAs by specific short non-coding RNAs (microRNAs, or miRNAs). Subsequently, miRNA-recruited Ago-2 containing complexes can induce translational repression and/or degradation of the target mRNAs (reviewed in [13]).

The results of RT-qPCR and Western blot assays in C2C12 myoblasts depleted of Ago-2 show an up-regulation of endogenous Pinch-2 mRNA and protein in Ago-2 depleted cells (Fig. 1A and B). We concluded that Pinch-2 can be a target of miRNA regulation in mouse myoblasts.

### 2.2. Pinch-2 expression is directly regulated by the miRNA let-7

We have analyzed the 3'UTR of PINCH-2 using the software available at [http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_prediction.html](http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html), and identified a number of potential miRNA-binding sites. Among these predictions, we were interested in four potential let-7 binding sites at positions 28, 67, 189, and 205 (Fig. 2A). Let-7 miRNA family is widely expressed, conserved and very well studied, and the best characterized let-7 targets are known to possess multiple let-7 sites in their 3'-UTRs [14]. In order to study the effect of let-7 on the expression of Pinch-2, we have cloned the 3'UTR of Pinch-2 into the luciferase reporter construct psiCheck2. The expression of the Renilla luciferase in this construct is regulated by the 3'UTR of interest, whereas the Firefly luciferase serves as an internal control of the transfection efficiency. Co-transfection of the psiCheck2-Pinch-2 construct with let-7g or control miRNAs showed that the 3'UTR of Pinch-2 is strongly and specifically regulated by let-7g miRNA (Fig. 2B). In addition to an irrelevant negative control miRNA, we have included in our experiments miR-193b, a miRNA that is expressed in myoblasts, but is not predicted to target Pinch-2. Site-directed mutagenesis of let-7 sites in the 3'UTR of Pinch-2 showed that all four sites are necessary for this repression, because their individual inactivation did not significantly release the let-7 dependent repression (Fig. 2C).

We have studied the expression of endogenous let-7g in C2C12 myoblasts, which was found to be relatively stable in proliferating or in differentiating cells (Fig. 2D). Subsequently, we have demonstrated that inhibition of let-7g expression by antisense LNA

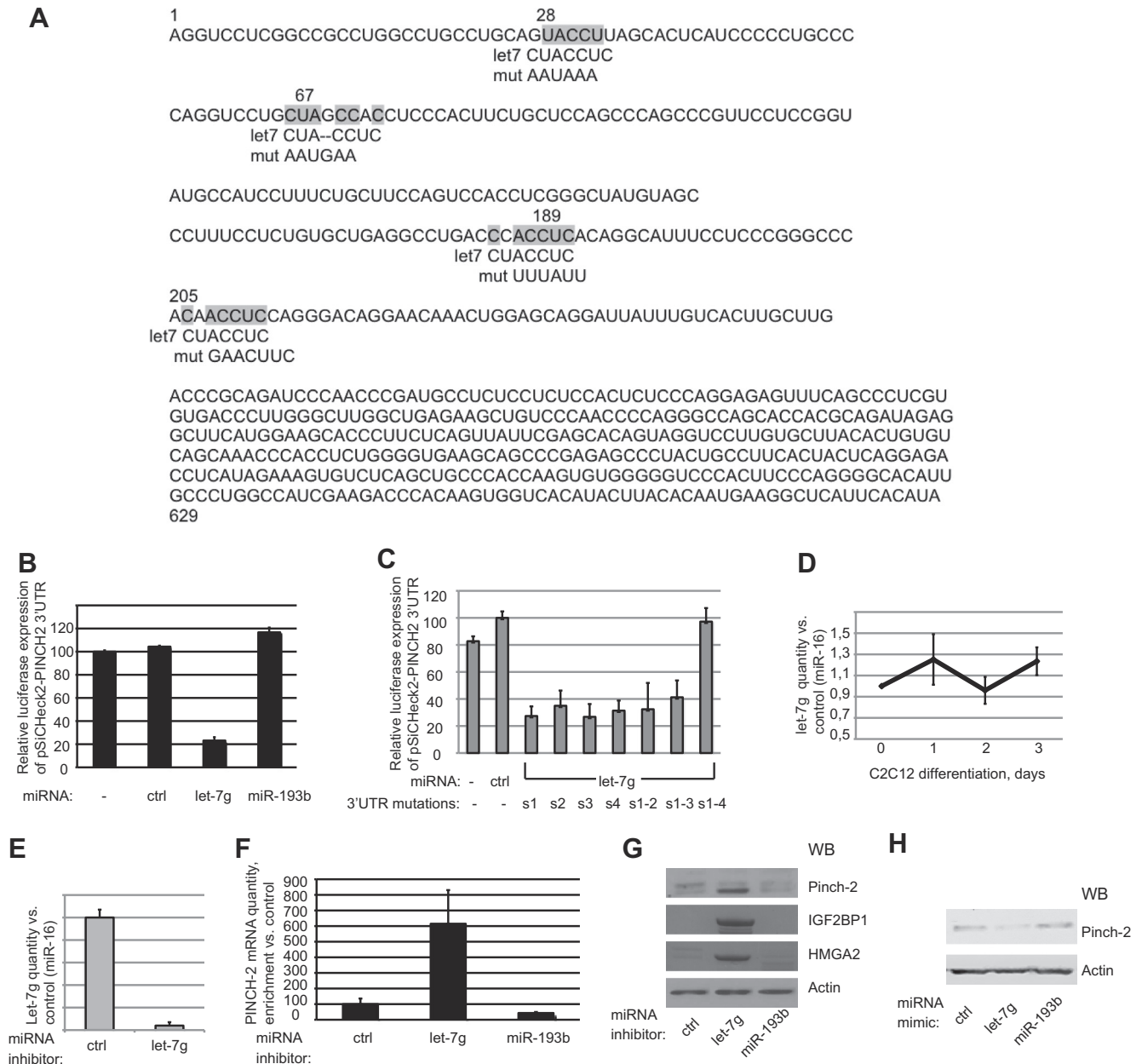


**Fig. 1.** Expression of Pinch-2 in mouse myoblasts is suppressed by Ago-2 protein. (A) Pinch-2 mRNA levels were quantified by RT-qPCR in C2C12 myoblasts transfected with the indicated siRNAs and collected 48 h post-transfection. Control: Cyclophilin A. (B) Western blot showing the protein levels of Ago-2, Pinch-2 and  $\beta$ -actin in cells described in A. Ago-2. 1–3 stand for three distinct siRNAs against Ago-2. We have subsequently studied the expression of endogenous let-7g in C2C12 myoblasts (Fig. 2D), and have demonstrated that inhibition of let-7g expression by antisense LNA (Locked Nucleic Acid) inhibitors was very efficient (Fig. 2E). A decrease of let-7g dramatically increased the levels of endogenous Pinch-2 mRNA and protein (Fig. 2F and G). As a positive control for the efficiency of let-7 inhibition, we have monitored two well-known let-7 targets, IGF2BP1 and HMGA2 [14]. In a complementary gain-of-function assay, transfection of mimic let-7g molecules led to a slight, but highly reproducible inhibition of Pinch-2 expression (Fig. 2H). The slight effect of ectopic let-7g on endogenous Pinch-2 is hardly surprising, given the abundance and variety of endogenous let-7 miRNAs.

(Locked Nucleic Acid) inhibitors was very efficient (Fig. 2E). A decrease of let-7g dramatically increased the levels of endogenous Pinch-2 mRNA and protein (Fig. 2F and G). As a positive control for the efficiency of let-7 inhibition, we have monitored two well-known let-7 targets, IGF2BP1 and HMGA2 [14]. In a complementary gain-of-function assay, transfection of let-7g mimic led to a slight, but highly reproducible inhibition of Pinch-2 expression (Fig. 2H). The slight effect of ectopic let-7g on endogenous Pinch-2 is hardly surprising, given the abundance and variety of endogenous let-7 miRNAs.

### 2.3. Let-7 and IMP-2 act independently to suppress the expression of Pinch-2

In our previous work, we have shown that Pinch-2 expression is down-regulated in C2C12 cells by the RNA-binding protein IMP-2, which interacts with the 3'UTR of Pinch-2 mRNA [10]. We have studied the regulation of endogenous Pinch-2 mRNA and protein by let-7g and IMP-2 by co-transfecting let-7g antisense inhibitor and/or two different siRNAs directed against IMP-2. In agreement with previous results, individual inhibition of let-7g or IMP-2 partially released the repression of Pinch-2 in C2C12 cells. A simultaneous inhibition of IMP-2 and let-7g led to a dramatic de-repression of Pinch-2 mRNA and protein (Fig. 3A and B). The de-repression obtained by a KD of let-7g and IMP-2 together was more important than the sum of the effects obtained by individual KDs of let-7g or of IMP-2. These results indicate that let-7g and IMP-2 repression factors can act independently on Pinch-2 3'UTR,



**Fig. 2.** Pinch-2 expression is directly regulated by the miRNA let-7. (A) A schema of the 3'UTR of mouse Pinch-2 with the potential target sites of let-7 miRNA shown in grey, numbers (28, 67, 189, 205) correspond to the positions of the first nucleotide of each target site, starting from the beginning of the 3'UTR. Let7: alignment with the seed sequence of let-7 family. Mut: mutations to potential let-7 target sites. (B) The 3'UTR of Pinch-2 was cloned into the pSiCheck2 reporter vector after the reporter gene (Renilla luciferase) and the relative levels of Renilla versus Firefly luciferase (the latter serving as a control of the transfection efficiency) were measured in C2C12 cells co-transfected with the indicated miRNA precursors, 24 h post-transfection. (C) The potential let-7 target sites in the 3'UTR of pSiCheck2-Pinch-2 were mutated individually or together, as indicated. Shown are the relative levels of Renilla versus Firefly luciferase measured in C2C12 cells co-transfected with control of let-7g miRNA precursors, 24 h post-transfection. (D) The expression of endogenous let-7g in C2C12 myoblasts in proliferation and differentiation was evaluated by RT-qPCR in three independent experiments (biological triplicate). (E) The efficiency of let-7g inhibition by LNA antisense inhibitor was evaluated by RT-qPCR. (F, G) The levels of endogenous Pinch-2 mRNA (F) and protein (G) were studied in C2C12 cells transfected with the indicated miRNA inhibitors and collected 48 h later. The levels of known let-7 targets IGF2BP1 and HMGA2 are monitored in (G) to evaluate the efficiency and specificity of let-7 inhibitor. (H) The levels of endogenous Pinch-2 protein in C2C12 cells transfected with the indicated miRNA mimics and collected 48 h later.

and that their simultaneous absence can have a synergistic positive effect on the expression of Pinch-2, probably by facilitating a recruitment of supplementary RNA-binding factors.

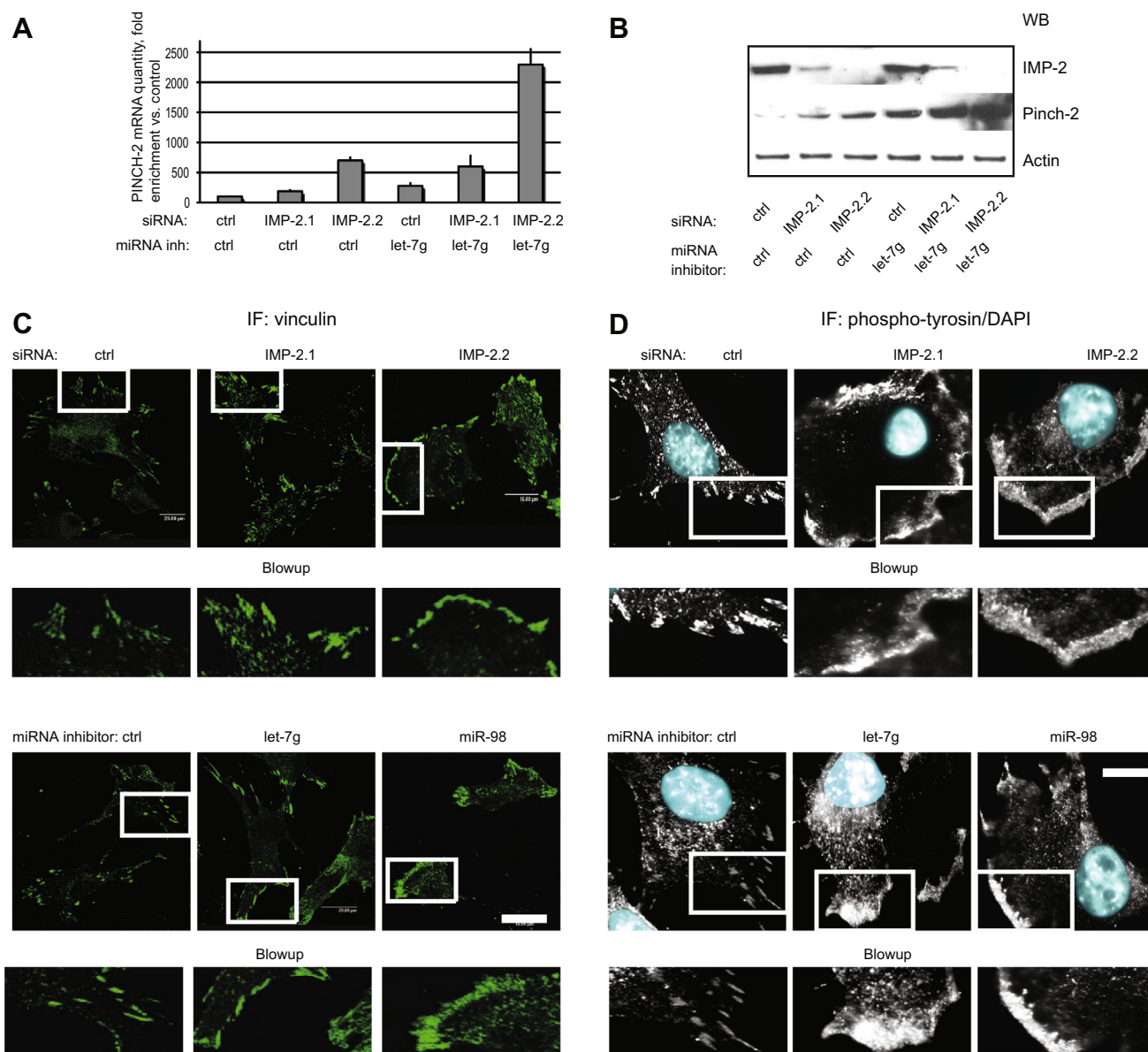
Consistent with these observations, inhibition of let-7g or of another let-7 family member, miR-98, in C2C12 myoblasts led to a remodeling of focal adhesions (FAs), similar to what can be observed in IMP-2 knock-down cells. FAs, here stained with vinculin or phospho-tyrosine antibody, appear as small individual structures in control cells, and have a strong tendency to cluster and/or fuse together in cells with inhibited let-7g/miR-98 or IMP-2

(Fig. 3C and D). This effect is consistent with what was previously observed in Pinch-2 overexpressing cells [10].

#### 2.4. Let-7 inhibits the motility of C2C12 myoblasts in a PINCH-2 dependent manner

We and others have previously shown that up-regulation of Pinch-2 decreases the cellular motility [7,10]. Therefore, it was interesting to find out whether the levels of let-7 impacted upon the motility of C2C12 myoblasts. We have performed loss- and



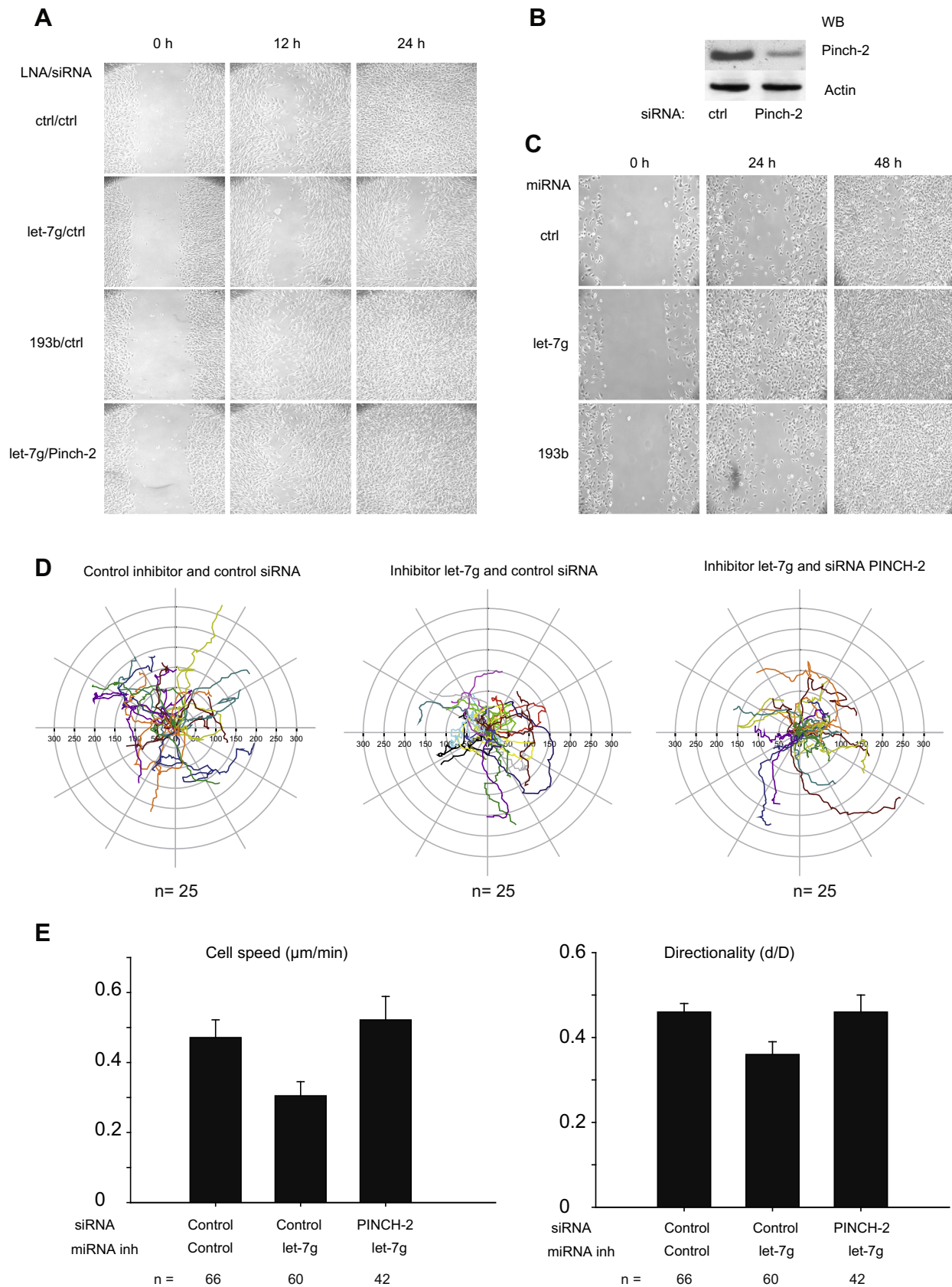


**Fig. 3.** Let-7 and IMP-2 act independently to suppress the expression of Pinch-2. (A, B) The levels of endogenous Pinch-2 mRNA (A) and protein (B) were studied in C2C12 cells transfected with the indicated miRNA inhibitors and siRNAs, and collected 48 h later. IMP-2.1 and .2 stand for two distinct siRNAs against IMP-2. (C) Confocal microscopy images of focal adhesions (FAs) (stained with anti-vinculin antibody) of C2C12 cells transfected with the indicated miRNA inhibitors and siRNAs, and collected 48 h later. Bar, 16  $\mu$ m. (D) Epifluorescent images of FAs (stained with anti-phosphotyrosine antibody) of C2C12 cells treated as in (C). Bar, 11  $\mu$ m.

gain-of-function experiments with antisense let-7g inhibitors and let-7g mimic, respectively, and have shown that inhibition of let-7g decreases the motility of C2C12 myoblasts in Pinch-2 dependent manner, as evaluated by the wound test (Fig. 4A). In this assay, the cells are transfected with the relevant miRNA inhibitors or mimics, and 48 h later a wound is made in the cellular monolayer. The relative speed of the closing of the wound corresponds to the changes in the cell motility. The decrease of let-7g levels led to a slowing-down of the closing of the wound, an effect that could be rescued by a simultaneous KD of Pinch-2 (Fig. 4A). The efficiency of Pinch-2 KD was analyzed by Western blot (Fig. 4B). Conversely, the transfection of ectopic let-7g miRNA led to an increase in the closing of the wound, as compared to the control (Fig. 4C). Thus, we concluded that let-7g can positively regulate the motility of C2C12 myoblasts. As let-7g expression levels do not change the proliferation rate of myoblasts [15], variations in cell numbers were not expected to contribute to the differences

in the rate of the wound closure in the current study. We confirmed this by performing the let-7g loss-of-function wound test experiments with and without mitomycin C treatment to inhibit proliferation (Fig. 4A and data not shown), and did not observe any impact of proliferation on the relative efficiency of the wound closure between let-7g KD and control cells in these experiments.

To evaluate the relative importance of Pinch-2 up-regulation in the overall decrease of cellular motility by let-7g KD, we have performed a quantitative cell migration assay using time lapse microscopy followed by a reconstruction of cell trajectory (Fig. 4D). Cell speed is defined as the average of all instantaneous speed for all cells. Directionality (d/D) is represented by the ratio of the shortest linear distance from the start to the end point (d) divided by the total track distance migrated by an individual cell (D). The results have clearly demonstrated that an inhibition of let-7g decreased the speed and directionality of C2C12 myoblasts by 33% and 20%, respectively (Fig. 4E). This effect was fully reversed when let-7g



**Fig. 4.** Let-7 inhibits the motility of C2C12 myoblasts in a PINCH-2 dependent manner. (A, C) Phase-contrast images of C2C12 cells transfected with the indicated miRNA inhibitors (A) or precursors (C). The cells were treated (A) or not (C) with mitomycin C to inhibit proliferation, wound test was induced 48 h post-transfection, and the images were taken 0, 12 and 24 h (A) or 0, 24, and 48 h (B) later. (B) The efficiency of Pinch-2 siRNA used in (A) was analyzed by Western blot. (D) C2C12 cells were transfected with the indicated siRNAs and miRNA inhibitors and the cell mobility was quantified as described in Section 4. A radar plot representation of cell mobility was generated using SigmaPlot (10.0). (E) A quantification of cell speed and directionality in C2C12 cell culture transfected with the indicated siRNAs and miRNA inhibitors (miRNA inh). Cell numbers are indicated for each experimental point (n).

and Pinch-2 were inhibited simultaneously (Fig. 4E). Therefore, let-7g controls the motility of C2C12 myoblasts by regulating the expression of the focal adhesion protein Pinch-2.

### 3. Discussion

The focal adhesion (FA) protein Pinch-2 protein is capable to remodel the composition of the FA complexes, thus modifying the spreading and motility of cells [7,8,10,16]. In many cell and tissue types, such as skeletal muscle, the capacity for long-range directional motility is essential for the initial formation of the tissue during embryonic development, as well as for its regeneration in adult life [17]. Thus, it was very interesting to elucidate the molecular mechanisms that control the expression of Pinch-2 on the post-transcriptional level in skeletal muscle myoblasts.

We have shown that there are four potential let-7 binding sites in the 3'UTR of Pinch-2, and together, these sites are necessary for a repression of Pinch-2 protein expression by let-7g. A mutation of each of these sites, or even of three sites out of four, does not release let-7g dependent repression. Interestingly, let-7g appears to repress Pinch-2 mRNA and protein independently of Pinch-2 post-transcriptional repressor IMP-2. To obtain a maximal expression level of Pinch-2, it is necessary to inactivate both let-7g and IMP-2. Therefore, the mRNA of Pinch-2 has multiple target sites for at least two post-transcriptional repressor factors in its 3'UTR. This tight, multiple-level control of Pinch-2 expression is consistent with the dramatic phenotypes induced by an overexpression of this protein, and with its functional importance in human and mouse cells.

Let-7 is one of the best-studied miRNA families, with numerous well-characterized mRNA targets and functions in development, differentiation and cancer (reviewed in [11,12]). Let-7 can have between one and six binding sites, mostly within the 3'UTR, but also within the coding region of its mRNA targets [18], reviewed in [19]. Whereas many studies identify individual and specific mRNA targets and functions for let-7 miRNAs, it was also suggested that they can simultaneously regulate the expression of thousands of genes, when overexpressed or inhibited in HeLa cells [20].

The mechanisms employed by let-7 miRNAs to specifically regulate given mRNA targets in a cell- and/or tissue-dependent manner can potentially include 3'UTR shortening via alternative polyadenylation [21,22], masking or exposing of specific target sites by RNA-binding proteins [23], subcellular compartmentalization of miRNA and/or its target mRNA [24], and others. However, these molecular mechanisms of let-7 target specificity have not been addressed experimentally so far. In this respect, Pinch-2 emerges as a very interesting novel target of let-7g, because it is efficiently down-regulated by this miRNA in normal skeletal myoblasts, leading to an increase in cellular motility. However, a recent study suggests that let-7a, b, and g can down-regulate the motility of breast cancer cells by acting on the actin cytoskeleton pathway [25]. This cell-type dependent action of let-7 raises an extremely intriguing possibility that these miRNAs can act in opposite ways while regulating the motility of normal versus cancer cells.

### 4. Materials and methods

Detailed experimental protocols are available on request.

#### 4.1. Cell culture, transfections, RNAi assays, miRNA mimics and inhibitors

Cell culture media and additives were purchased from Invitrogen. C2C12 mouse myoblasts were purchased from ATCC and cultured as recommended.

All the transfections were performed using LipoRNAiMAX (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. siRNA duplexes were transfected at 20 nM. Efficiency of RNAi was evaluated by qRT-PCR and/or Western blot.

siRNA target sequences:

IMP-2.1: TCGGGTAAAGTGAATTGCAT  
IMP-2.2: GGCATCAGTTTGAGGACTATT  
PINCH-2: ACCCTTGGGCTTGCTGAGAA  
AGO-2.1: CACTATGAATTGGACATCAAA  
AGO-2.2: CACGTTTCATCGTGGTGCAGAA  
AGO-2.3: AAGGGTAAAGTTTACCAAAGA  
Control, Irrelevant siRNA (Qiagen): AACTGCGGTGGGCTAGACCAT

MiRNA inhibitors (LNA™ oligos) were purchased from Exiqon and transfected at the final concentration of 75 nM. The sequences were: miR-193b; GCGGGACTTTGAGGGCCAGT, let-7g; ACTGTACAACTACTACCTC, miR-98; ACAATACAACCTACTACCTC, control; GTGTAACACGTCTATACGCCCA. MiRNA precursors (let-7g PM11758, miR-193b PM12383, Control#2 AM17111) were purchased from Ambion and transfected at the final concentration of 50 nM.

#### 4.2. Wound healing and quantitative cell migration assay

For the wound healing test, cells were seeded at a density of  $5 \times 10^4$  in 200  $\mu$ l of 2% FBS DMEM in 6 well plates and transfected with 20 nM siRNA using LipoRNAiMAX (Life Technologies). After 48 h, the monolayers were wounded by scratching with a plastic pipette tip. Images of wound healing were taken every 24 h and analyzed using an inverted microscope. For experiments with mitomycin C treated cells, the amount of cells per well was doubled, and the cells were treated with 20  $\mu$ g/ml mitomycin C for 2 h prior to scratching. Images of wound healing were taken every 12 h in these experiments.

For cell migration assays, C2C12 cells were transfected as described above with indicated LNA antisense oligonucleotides and siRNAs, and incubated for 48 h.  $5 \times 10^3$  of the cells were subsequently seeded on ibidi  $\mu$ -slide 8 well (Biovalley) coated with 10  $\mu$ g/ml of fibronectin (Invitrogen) and spread for 2 h before imaging. Time lapse microscopy was done during 24 h with image acquisition every 10 min using phase contrast illumination and a Plan-Apochromat 20 $\times$ /0.80 air objective. Random migration was measured using the plug-in MTrackJ, from Erik Meijering on ImageJ software. Cell speed is defined as the average of all instantaneous speed for all cells. Directionality (d/D) is represented by the ratio of the shortest linear distance from the start to the end point (d) divided by the total track distance migrated by an individual cell (D). Based on the coordinates obtained with MTrackJ, radar plot representation of cell mobility was generated using SigmaPlot (10.0).

#### 4.3. RT-qPCR

RT-qPCR primer sequences: PINCH-2: fw CGGATTCTGTGGTGAATTTGTCA; rev CTGGCAGATGAATTTGCCCAA; Ago-2: fw AAGTCGGACAGGAGCAGAAA; rev GAAACTTGCACTTCGCATCA; Cyclophilin A: fw GTCAACCCACCGTGTCTT; rev CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT.

#### 4.4. Luciferase assays

The 3'UTR of Pinch-2 was cloned into the MCS of pSiCheck2 reporter vector (Promega), the vector was transfected into C2C12 myoblasts using Lipofectamine 2000. 24 h later, the relative values



of Renilla versus Firefly luciferase were measured in transiently transfected C2C12 cells using the DualGlow kit (Promega) and a Mitras LB 940 luminometer (Berthold Technologies).

#### 4.5. Site-directed mutagenesis

Directed mutagenesis of potential let-7 target sites in the 3'UTR of Pinch-2 was performed using the QuikChange protocol from Stratagene and the following primers:

site 1 fw AGGTCCTCGGCCGCTGGCCTGCAAATAATAGCA CTCATCCCCCT, rev AGGGGGATGAGTGCTATTATTTCGAGGCAGGCC AGGCGGCCGAGGACCT, site 2 fw GCACTCATCCCCCTGCCCCAGGTC CTGAATGAATCCCACTTCTGCTCCAGCCC, rev GGGCTGGAGCAGAAGT GGGATTCAATCAGGACCTGGGGCAGGGGGATGAGTGC, site 3 fw CT TTCTCTGTGCTGAGGCCTGACCCTTTATTCAGGCATTTCCTCCCGGG, rev CCCGGGAGGAAATGCCTGAATAAAGGGTCAGGCCTCAGCACAGA GGAAAG, site 4 fw CATTTCTCCCGGGCCACAGAACTTCGGGACA GGAACAACTGGAG, rev CTCAGTTTGTCTGTCCCGAAGTTCTGT GGGCCCGGGAGGAAATG.

#### 4.6. Antibodies for Western blot and Immunofluorescence

IMP-2, rabbit antibodies kindly provided by Prof. F.C. Nielsen; Pinch-2, rabbit polyclonal, kind gift of Pr. Reinhard Fässler; phospho-tyrosin, clone 4G10, mouse monoclonal, kind gift of Dr. Eric Rubinstein; vinculin, clone V9131; Ago-2, clone 11A9;  $\beta$ -actin, clone AC-15 (Sigma); HMG2A, AF3184 (R&D Systems); IGF2BP1, sc-21026 (Santa Cruz).

Immunofluorescence: C2C12 mouse myoblasts were seeded on collagen-coated glass cover slides. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 20 min. After blocking with a solution containing 1% BSA and 5% serum in PBS for 1 h at room temperature, the cells were incubated with the primary antibody 1 h at room temperature, washed 3  $\times$  5 min in PBS, and visualized with Alexa Fluor 488 or Alexa 568 conjugated anti-mouse or anti-rabbit (Invitrogen). Nuclei were stained for 2 min with DAPI (Sigma) diluted 1  $\mu$ g/ml in PBS. Images were acquired using a fluorescent microscope Axiovert 2000 (Zeiss), Hamamatsu camera, and SimplePCI software. Confocal image acquisitions were carried out on a Zeiss LSM510 Meta confocal microscope with a Plan Neofluar 100 $\times$ , NA = 1.3 oil immersion objective. Pinhole apertures were set to one Airy unit for each wavelength.

#### Acknowledgements

The authors thank Drs. Jan Christianssen and Finn C. Nielsen for the kind gifts of antibodies and for helpful discussions, and Pr. Reinhard Fässler for PINCH-2 expression construct and antibody. This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies to AP. This study is part of the PhD thesis work of Selim Boudoukha, Thaiz Rivera Vargas, and Jérémie Kropp, with the expert technical help of Sylvain Cuvellier, under the direction of Anna Polesskaya. Irene Dang has performed the quantitative cell migration assays under the direction of Alexis Gautreau.

#### References

- [1] Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A.H., Wewer, U.M. and Nielsen, F.C. (1999) A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1262–1270.
- [2] Bell, J.L., Wachter, K., Muhleck, B., Pazaitis, N., Kohn, M., Lederer, M. and Huttelmaier, S. (2013) Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression?. *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (15), 2657–2675.
- [3] Oleynikov, Y. and Singer, R.H. (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr. Biol.* 13, 199–207.
- [4] Gu, W., Katz, Z., Wu, B., Park, H.Y., Li, D., Lin, S., Wells, A.L. and Singer, R.H. (2012) Regulation of local expression of cell adhesion and motility-related mRNAs in breast cancer cells by IMP1/ZBP1. *J. Cell Sci.* 125, 81–91.
- [5] Vikesaa, J., Hansen, T.V., Jonson, L., Borup, R., Wewer, U.M., Christiansen, J. and Nielsen, F.C. (2006) RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* 25, 1456–1468.
- [6] Wehrle-Haller, B. (2012) Structure and function of focal adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 116–124.
- [7] Zhang, Y., Chen, K., Guo, L. and Wu, C. (2002) Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J. Biol. Chem.* 277, 38328–38338.
- [8] Shi, X., Qu, H., Kretzler, M. and Wu, C. (2008) Roles of PINCH-2 in regulation of glomerular cell shape change and fibronectin matrix deposition. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 295, F253–263.
- [9] Schnorrer, F. and Dickson, B.J. (2004) Muscle building: mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev. Cell* 7, 9–20.
- [10] Boudoukha, S., Cuvellier, S. and Polesskaya, A. (2010) Role of the RNA-binding protein IMP-2 in muscle cell motility. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5710–5725.
- [11] Mondol, V. and Pasquinelli, A.E. (2012) Let's make it happen: the role of let-7 microRNA in development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 99, 1–30.
- [12] Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Liu, N. and You, Y. (2012) Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol. Lett.* 3, 955–960.
- [13] Wilson, R.C. and Doudna, J.A. (2013) Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 217–239.
- [14] Boyerinas, B., Park, S.M., Shomron, N., Hedegaard, M.M., Vinther, J., Andersen, J.S., Feig, C., Xu, J., Burge, C.B. and Peter, M.E. (2008) Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res.* 68, 2587–2591.
- [15] Polesskaya, A., Degerny, C., Pinna, G., Maury, Y., Kratassiouk, G., Mouly, V., Morozova, N., Kropp, J., Frandsen, N. and Harel-Bellan, A. (2013) Genome-wide exploration of miRNA function in mammalian muscle cell differentiation. *PLoS One* 8, e71927.
- [16] Fukuda, T., Chen, K., Shi, X. and Wu, C. (2003) PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J. Biol. Chem.* 278, 51324–51333.
- [17] Yusuf, F. and Brand-Saberi, B. (2012) Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem. Cell Biol.* 138, 187–199.
- [18] Forman, J.J., Legesse-Miller, A. and Coller, H.A. (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14879–14884.
- [19] Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E. and Peter, M.E. (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, F19–36.
- [20] Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63.
- [21] Mayr, C. and Bartel, D.P. (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138, 673–684.
- [22] Bava, F.A., Eliscovich, C., Ferreira, P.G., Minana, B., Ben-Dov, C., Guigo, R., Valcarcel, J. and Mendez, R. (2013) CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation. *Nature* 495, 121–125.
- [23] Jacobsen, A., Wen, J., Marks, D.S. and Krogh, A. (2010) Signatures of RNA binding proteins globally coupled to effective microRNA target sites. *Genome Res.* 20, 1010–1019.
- [24] Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I. and Filipowicz, W. (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124.
- [25] Hu, X., Guo, J., Zheng, L., Li, C., Zheng, T.M., Tanyi, J.L., Liang, S., Benedetto, C., Mitidieri, M., Katsaros, D., Zhao, X., Zhang, Y., Huang, Q. and Zhang, L. (2013) The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer. *Mol. Cancer Res.* 11, 240–250.

# Références

- Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1970. The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling". *Exp Cell Res.* 60:437-44.
- Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1971. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res.* 67:359-67.
- Abou-Kheir, W., B. Isaac, H. Yamaguchi, and D. Cox. 2008. Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *J Cell Sci.* 121:379-90.
- Ahuja, R., R. Pinyol, N. Reichenbach, L. Custer, J. Klingensmith, M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell.* 131:337-50.
- Akimov, S.S., and A.M. Belkin. 2001. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood.* 98:1567-76.
- Alberts, B. 1998. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell.* 92:291-4.
- Ammon, C., S.P. Meyer, L. Schwarzfischer, S.W. Krause, R. Andreesen, and M. Kreutz. 2000. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology.* 100:364-9.
- Andrianantoandro, E., and T.D. Pollard. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell.* 24:13-23.
- Anitei, M., and B. Hoflack. 2012. Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat Cell Biol.* 14:11-9.
- Anitei, M., C. Stange, I. Parshina, T. Baust, A. Schenck, G. Raposo, T. Kirchhausen, and B. Hoflack. 2010. Protein complexes containing CYFIP/Sra/PIR121 coordinate Arf1 and Rac1 signalling during clathrin-AP-1-coated carrier biogenesis at the TGN. *Nat Cell Biol.* 12:330-40.
- Arderm, H., E. Sandilands, L.M. Machesky, P. Timpson, M.C. Frame, and V.G. Brunton. 2006. Src-dependent phosphorylation of Scar1 promotes its association with the Arp2/3 complex. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:6-13.
- Aspenstrom, P. 2002. The WASP-binding protein WIRE has a role in the regulation of the actin filament system downstream of the platelet-derived growth factor receptor. *Exp Cell Res.* 279:21-33.
- Aspenstrom, P. 2004. The mammalian verprolin homologue WIRE participates in receptor-mediated endocytosis and regulation of the actin filament system by distinct mechanisms. *Exp Cell Res.* 298:485-98.
- Assoian, R.K., and M.A. Schwartz. 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev.* 11:48-53.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155:1319-32.
- Basu, R., and F. Chang. 2011. Characterization of dip1p reveals a switch in Arp2/3-dependent actin assembly for fission yeast endocytosis. *Curr Biol.* 21:905-16.
- Batlle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, and A. Garcia De Herreros. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2:84-9.
- Bear, J.E., J.F. Rawls, and C.L. Saxe, 3rd. 1998. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol.* 142:1325-35.
- Beckham, Y., R.J. Vasquez, J. Stricker, K. Sayegh, C. Campillo, and M.L. Gardel. 2014. Arp2/3 Inhibition Induces Amoeboid-Like Protrusions in MCF10A Epithelial Cells by Reduced Cytoskeletal-Membrane Coupling and Focal Adhesion Assembly. *PLoS One.* 9:e100943.

- Beltzner, C.C., and T.D. Pollard. 2004. Identification of functionally important residues of Arp2/3 complex by analysis of homology models from diverse species. *J Mol Biol.* 336:551-65.
- Benesch, S., S. Lommel, A. Steffen, T.E. Stradal, N. Scaplehorn, M. Way, J. Wehland, and K. Rottner. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem.* 277:37771-6.
- Benesch, S., S. Polo, F.P. Lai, K.I. Anderson, T.E. Stradal, J. Wehland, and K. Rottner. 2005. N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci.* 118:3103-15.
- Benseddik, K., N. Sen Nkwe, P. Daou, P. Verdier-Pinard, and A. Badache. 2013. ErbB2-dependent chemotaxis requires microtubule capture and stabilization coordinated by distinct signaling pathways. *PLoS One.* 8:e55211.
- Bergert, M., S.D. Chandradoss, R.A. Desai, and E. Paluch. 2012. Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:14434-9.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature.* 417:308-11.
- Blagg, S.L., M. Stewart, C. Sambles, and R.H. Insall. 2003. PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium. *Curr Biol.* 13:1480-7.
- Blanchoin, L., K.J. Amann, H.N. Higgs, J.B. Marchand, D.A. Kaiser, and T.D. Pollard. 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature.* 404:1007-11.
- Blaser, H., M. Reichman-Fried, I. Castanon, K. Dumstrei, F.L. Marlow, K. Kawakami, L. Solnica-Krezel, C.P. Heisenberg, and E. Raz. 2006. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell.* 11:613-27.
- Blick, T., E. Widodo, H. Hugo, M. Waltham, M.E. Lenburg, R.M. Neve, and E.W. Thompson. 2008. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis.* 25:629-42.
- Boczkowska, M., G. Rebowski, and R. Dominguez. 2013. GMF Interacts With Arp2/3 Complex In a Nucleotide State-Dependent Manner. *J Biol Chem.*
- Boczkowska, M., G. Rebowski, D.J. Kast, and R. Dominguez. 2014. Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-bound WCAs. *Nat Commun.* 5:3308.
- Boczkowska, M., G. Rebowski, M.V. Petoukhov, D.B. Hayes, D.I. Svergun, and R. Dominguez. 2008. X-ray scattering study of activated Arp2/3 complex with bound actin-WCA. *Structure.* 16:695-704.
- Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 129:865-77.
- Brandman, O., and T. Meyer. 2008. Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science.* 322:390-5.
- Bryce, N.S., E.S. Clark, J.L. Leysath, J.D. Currie, D.J. Webb, and A.M. Weaver. 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol.* 15:1276-85.
- Buck, M., W. Xu, and M.K. Rosen. 2001. Global disruption of the WASP autoinhibited structure on Cdc42 binding. Ligand displacement as a novel method for monitoring amide hydrogen exchange. *Biochemistry.* 40:14115-22.
- Bugyi, B., and M.F. Carlier. 2010. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu Rev Biophys.* 39:449-70.

- Burianek, L.E., and S.H. Soderling. 2013. Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes. *Semin Cell Dev Biol.* 24:258-66.
- Cai, L., A.M. Makhov, D.A. Schafer, and J.E. Bear. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell.* 134:828-42.
- Cai, L., T.W. Marshall, A.C. Uetrecht, D.A. Schafer, and J.E. Bear. 2007. Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge. *Cell.* 128:915-29.
- Callow, M.G., H. Tran, L. Phu, T. Lau, J. Lee, W.N. Sandoval, P.S. Liu, S. Bheddah, J. Tao, J.R. Lill, J.A. Hongo, D. Davis, D.S. Kirkpatrick, P. Polakis, and M. Costa. 2011. Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling. *PLoS One.* 6:e22595.
- Campellone, K.G., N.J. Webb, E.A. Znameroski, and M.D. Welch. 2008. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell.* 134:148-61.
- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:237-51.
- Cano, A., M.A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M.J. Blanco, M.G. del Barrio, F. Portillo, and M.A. Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2:76-83.
- Caracino, D., C. Jones, M. Compton, and C.L. Saxe, 3rd. 2007. The N-terminus of Dictyostelium Scar interacts with Abi and HSPC300 and is essential for proper regulation and function. *Mol Biol Cell.* 18:1609-20.
- Carlier, M.F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307-22.
- Carlier, M.F., P. Nioche, I. Broutin-L'Hermite, R. Boujemaa, C. Le Clainche, C. Egile, C. Garbay, A. Ducruix, P. Sansonetti, and D. Pantaloni. 2000. GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem.* 275:21946-52.
- Carlier, M.F., and D. Pantaloni. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol.* 269:459-67.
- Castro-Castro, A., V. Ojeda, M. Barreira, V. Sauzeau, I. Navarro-Lerida, O. Muriel, J.R. Couceiro, F.X. Pimentel-Muinos, M.A. Del Pozo, and X.R. Bustelo. 2011. Coronin 1A promotes a cytoskeletal-based feedback loop that facilitates Rac1 translocation and activation. *EMBO J.* 30:3913-27.
- Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science.* 276:1425-8.
- Chen, Z., D. Borek, S.B. Padrick, T.S. Gomez, Z. Metlagel, A.M. Ismail, J. Umetani, D.D. Billadeau, Z. Otwinowski, and M.K. Rosen. 2010. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature.* 468:533-8.
- Chereau, D., M. Boczkowska, A. Skwarek-Maruszewska, I. Fujiwara, D.B. Hayes, G. Rebowski, P. Lappalainen, T.D. Pollard, and R. Dominguez. 2008. Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science.* 320:239-43.
- Chereau, D., F. Kerff, P. Graceffa, Z. Grabarek, K. Langsetmo, and R. Dominguez. 2005. Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:16644-9.
- Chesarone, M.A., and B.L. Goode. 2009. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol.* 21:28-37.

- Chorev, D.S., O. Moscovitz, B. Geiger, and M. Sharon. 2014. Regulation of focal adhesion formation by a vinculin-Arp2/3 hybrid complex. *Nat Commun.* 5:3758.
- Clark, E.S., and A.M. Weaver. 2008. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol.* 87:581-90.
- Clark, E.S., A.S. Whigham, W.G. Yarbrough, and A.M. Weaver. 2007. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res.* 67:4227-35.
- Cory, G.O., R. Cramer, L. Blanchoin, and A.J. Ridley. 2003. Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell.* 11:1229-39.
- Cosen-Binker, L.I., and A. Kapus. 2006. Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda).* 21:352-61.
- Cote, J.F., and K. Vuori. 2007. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 17:383-93.
- Coutts, A.S., H. Boulahbel, A. Graham, and N.B. La Thangue. 2007. Mdm2 targets the p53 transcription cofactor JMY for degradation. *EMBO Rep.* 8:84-90.
- Coutts, A.S., L. Weston, and N.B. La Thangue. 2009. A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:19872-7.
- Dai, Z., and A.M. Pendergast. 1995. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 9:2569-82.
- Dang, I., and A. Gautreau. 2012. Evidence for a cell cycle checkpoint that senses branched actin in the lamellipodium. *Bioessays.* 34:1021-4.
- Dang, I., R. Gorelik, C. Sousa-Blin, E. Derivery, C. Guerin, J. Linkner, M. Nemethova, J.G. Dumortier, F.A. Giger, T.A. Chipysheva, V.D. Ermilova, S. Vacher, V. Campanacci, I. Herrada, A.G. Planson, S. Fetics, V. Henriot, V. David, K. Oguievetskaia, G. Lakisic, F. Pierre, A. Steffen, A. Boyreau, N. Peyrieras, K. Rottner, S. Zinn-Justin, J. Cherfils, I. Bieche, A.Y. Alexandrova, N.B. David, J.V. Small, J. Faix, L. Blanchoin, and A. Gautreau. 2013. Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. *Nature.* 503:281-4.
- Danuser, G., J. Allard, and A. Mogilner. 2013. Mathematical modeling of eukaryotic cell migration: insights beyond experiments. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29:501-28.
- Daou, P., S. Hasan, D. Breitsprecher, E. Baudelet, L. Camoin, S. Audebert, B.L. Goode, and A. Badache. 2013. Essential and nonredundant roles for Diaphanous formins in cortical microtubule capture and directed cell migration. *Mol Biol Cell.* 25:658-68.
- de Hostos, E.L., C. Rehfuess, B. Bradtke, D.R. Waddell, R. Albrecht, J. Murphy, and G. Gerisch. 1993. Dictyostelium mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol.* 120:163-73.
- DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burrige. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 159:881-91.
- Derivery, E., J. Fink, D. Martin, A. Houdusse, M. Piel, T.E. Stradal, D. Louvard, and A. Gautreau. 2008. Free Brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex. *PLoS One.* 3:e2462.
- Derivery, E., and A. Gautreau. 2010a. Evolutionary conservation of the WASH complex, an actin polymerization machine involved in endosomal fission. *Commun Integr Biol.* 3:227-30.
- Derivery, E., and A. Gautreau. 2010b. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *Bioessays.* 32:119-31.
- Derivery, E., E. Helfer, V. Henriot, and A. Gautreau. 2012. Actin polymerization controls the organization of WASH domains at the surface of endosomes. *PLoS One.* 7:e39774.

- Derivery, E., B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau. 2009a. The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil Cytoskeleton*. 66:777-90.
- Derivery, E., C. Sousa, J.J. Gautier, B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau. 2009b. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*. 17:712-23.
- Derry, J.M., H.D. Ochs, and U. Francke. 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 79:following 922.
- Disanza, A., A. Steffen, M. Hertzog, E. Frittoli, K. Rottner, and G. Scita. 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci*. 62:955-70.
- Drengk, A., J. Fritsch, C. Schmauch, H. Ruhling, and M. Maniak. 2003. A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol*. 13:1814-9.
- Duleh, S.N., and M.D. Welch. 2010. WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67:193-206.
- Duleh, S.N., and M.D. Welch. 2012. Regulation of integrin trafficking, cell adhesion, and cell migration by WASH and the Arp2/3 complex. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 69:1047-58.
- Eden, S., R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and M.W. Kirschner. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*. 418:790-3.
- Egile, C., I. Rouiller, X.P. Xu, N. Volkmann, R. Li, and D. Hanein. 2005. Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol*. 3:e383.
- Freedman, V.H., and S.I. Shin. 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*. 3:355-9.
- Friedl, P., and D. Gilmour. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:445-57.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp*:277-85.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2009. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*. 188:11-9.
- Friedl, P., K.S. Zanker, and E.B. Brocker. 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*. 43:369-78.
- Fritz, G., I. Just, and B. Kaina. 1999. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*. 81:682-7.
- Fukumi-Tominaga, T., Y. Mori, A. Matsuura, K. Kaneko, M. Matsui, M. Ogata, and M. Tominaga. 2009. DIP/WISH-deficient mice reveal Dia- and N-WASP-interacting protein as a regulator of cytoskeletal dynamics in embryonic fibroblasts. *Genes Cells*. 14:1197-207.
- Fukuoka, M., S. Suetsugu, H. Miki, K. Fukami, T. Endo, and T. Takenawa. 2001. A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol*. 152:471-82.
- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*. 109:611-23.
- Gandhi, M., V. Achard, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2009. Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol Cell*. 34:364-74.
- Gandhi, M., B.A. Smith, M. Bovellan, V. Paavilainen, K. Daugherty-Clarke, J. Gelles, P. Lappalainen, and B.L. Goode. 2010. GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation. *Curr Biol*. 20:861-7.

- Gautier, J.J., M.E. Lomakina, L. Bouslama-Oueghlani, E. Derivery, H. Beilinson, W. Faigle, D. Loew, D. Louvard, A. Echard, A.Y. Alexandrova, B. Baum, and A. Gautreau. 2011. Clathrin is required for Scar/Wave-mediated lamellipodium formation. *J Cell Sci.* 124:3414-27.
- Gautreau, A., H.Y. Ho, J. Li, H. Steen, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2004. Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4379-83.
- Gautreau, A., K. Oguievetskaia, and C. Ungermann. 2014. Function and regulation of the endosomal fusion and fission machineries. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6.
- Giannone, G., R.M. Mege, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* 19:475-86.
- Goley, E.D., S.E. Rodenbusch, A.C. Martin, and M.D. Welch. 2004. Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor. *Mol Cell.* 16:269-79.
- Gomez, T.S., and D.D. Billadeau. 2009. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell.* 17:699-711.
- Gomez, T.S., J.A. Gorman, A.A. de Narvajias, A.O. Koenig, and D.D. Billadeau. 2012. Trafficking defects in WASH-knockout fibroblasts originate from collapsed endosomal and lysosomal networks. *Mol Biol Cell.* 23:3215-28.
- Goode, B.L., and M.J. Eck. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem.* 76:593-627.
- Gov, N.S., and A. Bernheim-Groswasser. 2012. Releasing the brakes while hanging on: Cortactin effects on actin-driven motility. *Bioarchitecture.* 2:11-14.
- Gregory, P.A., C.P. Bracken, A.G. Bert, and G.J. Goodall. 2008. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle.* 7:3112-8.
- Gross, S.R. 2013. Actin binding proteins: their ups and downs in metastatic life. *Cell Adh Migr.* 7:199-213.
- Guettler, S., J. LaRose, E. Petsalaki, G. Gish, A. Scotter, T. Pawson, R. Rottapel, and F. Sicheri. 2011. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell.* 147:1340-54.
- Hahne, P., A. Sechi, S. Benesch, and J.V. Small. 2001. Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* 492:215-20.
- Hao, Y.H., J.M. Doyle, S. Ramanathan, T.S. Gomez, D. Jia, M. Xu, Z.J. Chen, D.D. Billadeau, M.K. Rosen, and P.R. Potts. 2013. Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell.* 152:1051-64.
- Harbour, M.E., S.Y. Breusegem, R. Antrobus, C. Freeman, E. Reid, and M.N. Seaman. 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci.* 123:3703-17.
- Hawkins, R.J., M. Piel, G. Faure-Andre, A.M. Lennon-Dumenil, J.F. Joanny, J. Prost, and R. Voituriez. 2009. Pushing off the walls: a mechanism of cell motility in confinement. *Phys Rev Lett.* 102:058103.
- Hawkins, R.J., R. Poincloux, O. Benichou, M. Piel, P. Chavrier, and R. Voituriez. 2011. Spontaneous contractility-mediated cortical flow generates cell migration in three-dimensional environments. *Biophys J.* 101:1041-5.
- Helfer, E., M.E. Harbour, V. Henriot, G. Lakisic, C. Sousa-Blin, L. Volceanov, M.N. Seaman, and A. Gautreau. 2013. Endosomal recruitment of the WASH complex: active sequences and mutations impairing interaction with the retromer. *Biol Cell.* 105:191-207.
- Helfer, E., E.M. Nevalainen, P. Naumanen, S. Romero, D. Didry, D. Pantaloni, P. Lappalainen, and M.F. Carlier. 2006. Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility. *EMBO J.* 25:1184-95.



- Hertzog, M., F. Milanesi, L. Hazelwood, A. Disanza, H. Liu, E. Perlade, M.G. Malabarba, S. Pasqualato, A. Maiolica, S. Confalonieri, C. Le Clainche, N. Offenhauser, J. Block, K. Rottner, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, N. Volkmann, D. Hanein, and G. Scita. 2010. Molecular basis for the dual function of Eps8 on actin dynamics: bundling and capping. *PLoS Biol.* 8:e1000387.
- Higgs, H.N., L. Blanchoin, and T.D. Pollard. 1999. Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry.* 38:15212-22.
- Higgs, H.N., and T.D. Pollard. 2000. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 150:1311-20.
- Ho, H.Y., R. Rohatgi, A.M. Lebensohn, M. Le, J. Li, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell.* 118:203-16.
- Ho, H.Y., R. Rohatgi, L. Ma, and M.W. Kirschner. 2001. CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11306-11.
- Holmes, K.C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 347:44-9.
- Huang, C.H., M. Tang, C. Shi, P.A. Iglesias, and P.N. Devreotes. 2013. An excitable signal integrator couples to an idling cytoskeletal oscillator to drive cell migration. *Nat Cell Biol.* 15:1307-16.
- Huang, S.M., Y.M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G.A. Michaud, O. Charlat, E. Wiellette, Y. Zhang, S. Wiessner, M. Hild, X. Shi, C.J. Wilson, C. Mickanin, V. Myer, A. Fazal, R. Tomlinson, F. Serluca, W. Shao, H. Cheng, M. Shultz, C. Rau, M. Schirle, J. Schlegl, S. Ghidelli, S. Fawell, C. Lu, D. Curtis, M.W. Kirschner, C. Lengauer, P.M. Finan, J.A. Tallarico, T. Bouwmeester, J.A. Porter, A. Bauer, and F. Cong. 2009. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature.* 461:614-20.
- Humphries, C.L., H.I. Balcer, J.L. D'Agostino, B. Winsor, D.G. Drubin, G. Barnes, B.J. Andrews, and B.L. Goode. 2002. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol.* 159:993-1004.
- Ibarra, N., S.L. Blagg, F. Vazquez, and R.H. Insall. 2006. Nap1 regulates Dictyostelium cell motility and adhesion through SCAR-dependent and -independent pathways. *Curr Biol.* 16:717-22.
- Iglesias, P.A., and P.N. Devreotes. 2012. Biased excitable networks: how cells direct motion in response to gradients. *Curr Opin Cell Biol.* 24:245-53.
- Iijima, M., and P. Devreotes. 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell.* 109:599-610.
- Imai, K., S. Nonoyama, and H.D. Ochs. 2003. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 3:427-36.
- Innocenti, M., A. Zucconi, A. Disanza, E. Frittoli, L.B. Areces, A. Steffen, T.E. Stradal, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, and G. Scita. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol.* 6:319-27.
- Isenberg, G., U. Aebi, and T.D. Pollard. 1980. An actin-binding protein from Acanthamoeba regulates actin filament polymerization and interactions. *Nature.* 288:455-9.
- Jia, D., T.S. Gomez, D.D. Billadeau, and M.K. Rosen. 2012. Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol Biol Cell.* 23:2352-61.
- Jia, D., T.S. Gomez, Z. Metlagel, J. Umetani, Z. Otwinowski, M.K. Rosen, and D.D. Billadeau. 2010. WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:10442-7.

- Kaksonen, M., H.B. Peng, and H. Rauvala. 2000. Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4421-6.
- Kato, M., H. Miki, S. Kurita, T. Endo, H. Nakagawa, S. Miyamoto, and T. Takenawa. 2002. WICH, a novel verprolin homology domain-containing protein that functions cooperatively with N-WASP in actin-microspike formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:41-7.
- Kaverina, I., and A. Straube. 2011. Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol.* 22:968-74.
- Keller, H., and P. Eggli. 1998. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil Cytoskeleton.* 41:181-93.
- Kim, A.S., L.T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G.A. Liu, and M.K. Rosen. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature.* 404:151-8.
- Kim, D.J., S.H. Kim, C.S. Lim, K.Y. Choi, C.S. Park, B.H. Sung, M.G. Yeo, S. Chang, J.K. Kim, and W.K. Song. 2006a. Interaction of SPIN90 with the Arp2/3 complex mediates lamellipodia and actin comet tail formation. *J Biol Chem.* 281:617-25.
- Kim, S.H., H.J. Choi, K.W. Lee, N.H. Hong, B.H. Sung, K.Y. Choi, S.M. Kim, S. Chang, S.H. Eom, and W.K. Song. 2006b. Interaction of SPIN90 with syndapin is implicated in clathrin-mediated endocytic pathway in fibroblasts. *Genes Cells.* 11:1197-211.
- Kim, Y., J.Y. Sung, I. Ceglia, K.W. Lee, J.H. Ahn, J.M. Halford, A.M. Kim, S.P. Kwak, J.B. Park, S. Ho Ryu, A. Schenck, B. Bardoni, J.D. Scott, A.C. Nairn, and P. Greengard. 2006c. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature.* 442:814-7.
- King, J.S., D.M. Veltman, M. Georgiou, B. Baum, and R.H. Insall. 2010. SCAR/WAVE is activated at mitosis and drives myosin-independent cytokinesis. *J Cell Sci.* 123:2246-55.
- Kobayashi, K., S. Kuroda, M. Fukata, T. Nakamura, T. Nagase, N. Nomura, Y. Matsuura, N. Yoshida-Kubomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1998. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem.* 273:291-5.
- Kolsch, V., P.G. Charest, and R.A. Firtel. 2008. The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci.* 121:551-9.
- Kondylis, V., H.E. van Nispen tot Pannerden, B. Herpers, F. Friggi-Grelin, and C. Rabouille. 2007. The golgi comprises a paired stack that is separated at G2 by modulation of the actin cytoskeleton through Abi and Scar/WAVE. *Dev Cell.* 12:901-15.
- Kowalski, J.R., C. Egile, S. Gil, S.B. Snapper, R. Li, and S.M. Thomas. 2005. Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci.* 118:79-87.
- Kreishman-Deitrick, M., E.D. Goley, L. Burdine, C. Denison, C. Egile, R. Li, N. Murali, T.J. Kodadek, M.D. Welch, and M.K. Rosen. 2005. NMR analyses of the activation of the Arp2/3 complex by neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry.* 44:15247-56.
- Krzewski, K., X. Chen, J.S. Orange, and J.L. Strominger. 2006. Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol.* 173:121-32.
- Kunda, P., G. Craig, V. Dominguez, and B. Baum. 2003. Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol.* 13:1867-75.
- Kurosaka, S., and A. Kashina. 2008. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 84:102-22.
- Lai, F.P., M. Szczodrak, J.M. Oelkers, M. Ladwein, F. Acconcia, S. Benesch, S. Auinger, J. Faix, J.V. Small, S. Polo, T.E. Stradal, and K. Rottner. 2009. Cortactin promotes migration and platelet-

- derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell*. 20:3209-23.
- Lammermann, T., B.L. Bader, S.J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D.R. Critchley, R. Fassler, and M. Sixt. 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*. 453:51-5.
- Lehtio, L., N.W. Chi, and S. Krauss. 2013. Tankyrases as drug targets. *FEBS J*. 280:3576-93.
- Leng, Y., J. Zhang, K. Badour, E. Arpaia, S. Freeman, P. Cheung, M. Siu, and K. Siminovitch. 2005. Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:1098-103.
- Liao, G., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen. 1995. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci*. 108 ( Pt 11):3473-83.
- Linardopoulou, E.V., S.S. Parghi, C. Friedman, G.E. Osborn, S.M. Parkhurst, and B.J. Trask. 2007. Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet*. 3:e237.
- Lippert, D.N., and J.A. Wilkins. 2012. Glia maturation factor gamma regulates the migration and adherence of human T lymphocytes. *BMC Immunol*. 13:21.
- Liu, R., M.T. Abreu-Blanco, K.C. Barry, E.V. Linardopoulou, G.E. Osborn, and S.M. Parkhurst. 2009. Wash functions downstream of Rho and links linear and branched actin nucleation factors. *Development*. 136:2849-60.
- Liu, S.L., K.M. Needham, J.R. May, and B.J. Nolen. 2011. Mechanism of a concentration-dependent switch between activation and inhibition of Arp2/3 complex by coronin. *J Biol Chem*. 286:17039-46.
- Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.F. Carrier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*. 401:613-6.
- Lorentzen, A., J. Bamber, A. Sadok, I. Elson-Schwab, and C.J. Marshall. 2010. An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J Cell Sci*. 124:1256-67.
- Luan, Q., and B.J. Nolen. 2013. Structural basis for regulation of Arp2/3 complex by GMF. *Nat Struct Mol Biol*.
- Machesky, L.M., S.J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and T.D. Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*. 127:107-15.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 8:1347-56.
- Machesky, L.M., R.D. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:3739-44.
- Mackay, C.R. 2008. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol*. 9:988-98.
- Malawista, S.E., A. de Boisfleury Chevance, and L.A. Boxer. 2000. Random locomotion and chemotaxis of human blood polymorphonuclear leukocytes from a patient with leukocyte adhesion deficiency-1: normal displacement in close quarters via chimneying. *Cell Motil Cytoskeleton*. 46:183-9.
- Maness, P.F., and R.C. Walsh, Jr. 1982. Dihydrocytochalasin B disorganizes actin cytoarchitecture and inhibits initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell*. 30:253-62.
- Marchand, J.B., D.A. Kaiser, T.D. Pollard, and H.N. Higgs. 2001. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol*. 3:76-82.

- Maritzen, T., T. Zech, M.R. Schmidt, E. Krause, L.M. Machesky, and V. Haucke. 2012. Gadkin negatively regulates cell spreading and motility via sequestration of the actin-nucleating ARP2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:10382-7.
- Martinez-Quiles, N., H.Y. Ho, M.W. Kirschner, N. Ramesh, and R.S. Geha. 2004. Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol*. 24:5269-80.
- Martinez-Quiles, N., R. Rohatgi, I.M. Anton, M. Medina, S.P. Saville, H. Miki, H. Yamaguchi, T. Takenawa, J.H. Hartwig, R.S. Geha, and N. Ramesh. 2001. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol*. 3:484-91.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:446-54.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol*. 138:771-81.
- Meinhardt, H. 1999. Orientation of chemotactic cells and growth cones: models and mechanisms. *J Cell Sci*. 112 ( Pt 17):2867-74.
- Mejillano, M.R., S. Kojima, D.A. Applewhite, F.B. Gertler, T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 2004. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell*. 118:363-73.
- Meng, W., M. Numazaki, K. Takeuchi, Y. Uchibori, Y. Ando-Akatsuka, M. Tominaga, and T. Tominaga. 2004. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *EMBO J*. 23:760-71.
- Merrifield, C.J., B. Qualmann, M.M. Kessels, and W. Almers. 2004. Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 83:13-8.
- Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J.K. Westwick, and F.G. Giancotti. 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell*. 8:115-27.
- Miki, H., K. Miura, and T. Takenawa. 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*. 15:5326-35.
- Miki, H., T. Sasaki, Y. Takai, and T. Takenawa. 1998a. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*. 391:93-6.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998b. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J*. 17:6932-41.
- Miki, H., H. Yamaguchi, S. Suetsugu, and T. Takenawa. 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*. 408:732-5.
- Miyamoto, Y., J. Yamauchi, and A. Tanoue. 2008. Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn. *J Neurosci*. 28:8326-37.
- Mizutani, K., H. Miki, H. He, H. Maruta, and T. Takenawa. 2002. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res*. 62:669-74.
- Mockrin, S.C., and E.D. Korn. 1980. Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*. 19:5359-62.
- Morin, N.A., P.W. Oakes, Y.M. Hyun, D. Lee, Y.E. Chin, M.R. King, T.A. Springer, M. Shimaoka, J.X. Tang, J.S. Reichner, and M. Kim. 2008. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *J Exp Med*. 205:195-205.

- Morrone, S., Z. Cheng, R.T. Moon, F. Cong, and W. Xu. 2012. Crystal structure of a Tankyrase-Axin complex and its implications for Axin turnover and Tankyrase substrate recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:1500-5.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6181-6.
- Neilson, M.P., D.M. Veltman, P.J. van Haastert, S.D. Webb, J.A. Mackenzie, and R.H. Insall. 2011. Chemotaxis: a feedback-based computational model robustly predicts multiple aspects of real cell behaviour. *PLoS Biol*. 9:e1000618.
- Neubrand, V.E., R.D. Will, W. Mobius, A. Poustka, S. Wiemann, P. Schu, C.G. Dotti, R. Pepperkok, and J.C. Simpson. 2005. Gamma-BAR, a novel AP-1-interacting protein involved in post-Golgi trafficking. *EMBO J*. 24:1122-33.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81:53-62.
- Nurnberg, A., T. Kitzing, and R. Grosse. 2011. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer*. 11:177-87.
- Oh, H., H. Kim, K.H. Chung, N.H. Hong, B. Shin, W.J. Park, Y. Jun, S. Rhee, and W.K. Song. 2013. SPIN90 knockdown attenuates the formation and movement of endosomal vesicles in the early stages of epidermal growth factor receptor endocytosis. *PLoS One*. 8:e82610.
- Oikawa, T., H. Yamaguchi, T. Itoh, M. Kato, T. Ijuin, D. Yamazaki, S. Suetsugu, and T. Takenawa. 2004. PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol*. 6:420-6.
- Okreglak, V., and D.G. Drubin. 2007. Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J Cell Biol*. 178:1251-64.
- Otomo, T., D.R. Tomchick, C. Otomo, S.C. Panchal, M. Machius, and M.K. Rosen. 2005. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*. 433:488-94.
- Padrick, S.B., H.C. Cheng, A.M. Ismail, S.C. Panchal, L.K. Doolittle, S. Kim, B.M. Skehan, J. Umetani, C.A. Brautigam, J.M. Leong, and M.K. Rosen. 2008. Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Mol Cell*. 32:426-38.
- Padrick, S.B., L.K. Doolittle, C.A. Brautigam, D.S. King, and M.K. Rosen. 2011. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:E472-9.
- Paluch, E., M. Piel, J. Prost, M. Bornens, and C. Sykes. 2005. Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys J*. 89:724-33.
- Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol*. 170:793-802.
- Pankova, K., D. Rosel, M. Novotny, and J. Brabek. 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*. 67:63-71.
- Petroll, W.M., and L. Ma. 2003. Direct, dynamic assessment of cell-matrix interactions inside fibrillar collagen lattices. *Cell Motil Cytoskeleton*. 55:254-64.
- Pille, J.Y., C. Denoyelle, J. Varet, J.R. Bertrand, J. Soria, P. Opolon, H. Lu, L.L. Pritchard, J.P. Vannier, C. Malvy, C. Soria, and H. Li. 2005. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther*. 11:267-74.
- Piotrowski, J.T., T.S. Gomez, R.A. Schoon, A.K. Mangalam, and D.D. Billadeau. 2013. WASH knockout T cells demonstrate defective receptor trafficking, proliferation, and effector function. *Mol Cell Biol*. 33:958-73.

- Pocha, S.M., and G.O. Cory. 2009. WAVE2 is regulated by multiple phosphorylation events within its VCA domain. *Cell Motil Cytoskeleton*. 66:36-47.
- Poincloux, R., O. Collin, F. Lizarraga, M. Romao, M. Debray, M. Piel, and P. Chavrier. 2011. Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:1943-8.
- Pollard, T.D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 36:451-77.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 1984. Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry*. 23:6631-41.
- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 326:1208-12.
- Pollitt, A.Y., and R.H. Insall. 2008. Abi mutants in Dictyostelium reveal specific roles for the SCAR/WAVE complex in cytokinesis. *Curr Biol*. 18:203-10.
- Prehoda, K.E., J.A. Scott, R.D. Mullins, and W.A. Lim. 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science*. 290:801-6.
- Pring, M., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, and S.H. Zigmond. 2003. Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*. 42:486-96.
- Puthenveedu, M.A., B. Lauffer, P. Temkin, R. Vistein, P. Carlton, K. Thorn, J. Taunton, O.D. Weiner, R.G. Parton, and M. von Zastrow. 2010. Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell*. 143:761-73.
- Quinlan, M.E., J.E. Heuser, E. Kerkhoff, and R.D. Mullins. 2005. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*. 433:382-8.
- Ren, G., M.S. Crampton, and A.S. Yap. 2009. Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil Cytoskeleton*. 66:865-73.
- Riffell, J.L., C.J. Lord, and A. Ashworth. 2012. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov*. 11:923-36.
- Robinson, R.C., K. Turbedsky, D.A. Kaiser, J.B. Marchand, H.N. Higgs, S. Choe, and T.D. Pollard. 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*. 294:1679-84.
- Rocca, D.L., S. Martin, E.L. Jenkins, and J.G. Hanley. 2008. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*. 10:259-71.
- Rodal, A.A., O. Sokolova, D.B. Robins, K.M. Daugherty, S. Hippenmeyer, H. Riezman, N. Grigorieff, and B.L. Goode. 2005. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol*. 12:26-31.
- Rogers, S.L., U. Wiedemann, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2003. Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells. *J Cell Biol*. 162:1079-88.
- Rohatgi, R., H.Y. Ho, and M.W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*. 150:1299-310.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M.W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. 97:221-31.
- Rohatgi, R., P. Nollau, H.Y. Ho, M.W. Kirschner, and B.J. Mayer. 2001. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem*. 276:26448-52.

- Rorth, P. 2011. Whence directionality: guidance mechanisms in solitary and collective cell migration. *Dev Cell*. 20:9-18.
- Rosenblatt, J., B.J. Agnew, H. Abe, J.R. Bamburg, and T.J. Mitchison. 1997. Xenopus actin depolymerizing factor/cofilin (XAC) is responsible for the turnover of actin filaments in *Listeria monocytogenes* tails. *J Cell Biol*. 136:1323-32.
- Rosman, D.S., S. Phukan, C.C. Huang, and B. Pasche. 2008. TGFBR1\*6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation. *Cancer Res*. 68:1319-28.
- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:167-80.
- Rotty, J.D., C. Wu, and J.E. Bear. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:7-12.
- Rouiller, I., X.P. Xu, K.J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T.D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*. 180:887-95.
- Sahai, E., and C.J. Marshall. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*. 5:711-9.
- Sanchez-Madrid, F., and M.A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J*. 18:501-11.
- Sanchez-Madrid, F., and J.M. Serrador. 2009. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:353-9.
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai, and C.J. Marshall. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*. 135:510-23.
- Sanz-Moreno, V., and C.J. Marshall. 2010. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 22:690-6.
- Satoh, S., and T. Tominaga. 2001. mDia-interacting protein acts downstream of Rho-mDia and modifies Src activation and stress fiber formation. *J Biol Chem*. 276:39290-4.
- Sawa, M., and T. Takenawa. 2006. *Caenorhabditis elegans* WASP-interacting protein homologue WIP-1 is involved in morphogenesis through maintenance of WSP-1 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 340:709-17.
- Sbodio, J.I., and N.W. Chi. 2002. Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner. *J Biol Chem*. 277:31887-92.
- Schmick, M., and P.I. Bastiaens. 2014. The interdependence of membrane shape and cellular signal processing. *Cell*. 156:1132-8.
- Schmidt, M.R., T. Maritzen, V. Kukhtina, V.A. Higman, L. Doglio, N.N. Barak, H. Strauss, H. Oschkinat, C.G. Dotti, and V. Haucke. 2009. Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:15344-9.
- Scita, G., S. Confalonieri, P. Lappalainen, and S. Suetsugu. 2008. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol*. 18:52-60.
- Seimiya, H., Y. Muramatsu, S. Smith, and T. Tsuruo. 2004. Functional subdomain in the ankyrin domain of tankyrase 1 required for poly(ADP-ribosylation) of TRF1 and telomere elongation. *Mol Cell Biol*. 24:1944-55.
- Sells, M.A., J.T. Boyd, and J. Chernoff. 1999. p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol*. 145:837-49.

- Senoo, H., and M. Iijima. 2013. Rho GTPase: A molecular compass for directional cell migration. *Commun Integr Biol.* 6:e27681.
- Serrels, B., A. Serrels, V.G. Brunton, M. Holt, G.W. McLean, C.H. Gray, G.E. Jones, and M.C. Frame. 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 9:1046-56.
- Sheetz, M.P., D. Felsenfeld, C.G. Galbraith, and D. Choquet. 1999. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp.* 65:233-43.
- Shen, Q.T., P.P. Hsiue, C.V. Sindelar, M.D. Welch, K.G. Campellone, and H.W. Wang. 2012. Structural insights into WHAMM-mediated cytoskeletal coordination during membrane remodeling. *J Cell Biol.* 199:111-24.
- Shi, Y., K. Alin, and S.P. Goff. 1995. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev.* 9:2583-97.
- Shikama, N., C.W. Lee, S. France, L. Delavaine, J. Lyon, M. Krstic-Demonacos, and N.B. La Thangue. 1999. A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell.* 4:365-76.
- Shin, S.I., V.H. Freedman, R. Risser, and R. Pollack. 1975. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:4435-9.
- Siegel, L.M., and K.J. Monty. 1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim Biophys Acta.* 112:346-62.
- Siton, O., Y. Ideses, S. Albeck, T. Unger, A.D. Bershadsky, N.S. Gov, and A. Bernheim-Groswasser. 2011. Cortactin releases the brakes in actin- based motility by enhancing WASP-VCA detachment from Arp2/3 branches. *Curr Biol.* 21:2092-7.
- Smith, A., M. Bracke, B. Leitinger, J.C. Porter, and N. Hogg. 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci.* 116:3123-33.
- Smith, S., I. Gariat, A. Schmitt, and T. de Lange. 1998. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science.* 282:1484-7.
- Sommers, C.L., S.W. Byers, E.W. Thompson, J.A. Torri, and E.P. Gelmann. 1994. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 31:325-35.
- Sossey-Alaoui, K., K. Head, N. Nowak, and J.K. Cowell. 2003. Genomic organization and expression profile of the human and mouse WAVE gene family. *Mamm Genome.* 14:314-22.
- Sossey-Alaoui, K., X. Li, and J.K. Cowell. 2007a. c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE3 is required for lamellipodia formation and cell migration. *J Biol Chem.* 282:26257-65.
- Sossey-Alaoui, K., A. Safina, X. Li, M.M. Vaughan, D.G. Hicks, A.V. Bakin, and J.K. Cowell. 2007b. Down-regulation of WAVE3, a metastasis promoter gene, inhibits invasion and metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol.* 170:2112-21.
- Steffen, A., M. Ladwein, G.A. Dimchev, A. Hein, L. Schwenkmezger, S. Arens, K.I. Ladwein, J. Margit Holleboom, F. Schur, J. Victor Small, J. Schwarz, R. Gerhard, J. Faix, T.E. Stradal, C. Brakebusch, and K. Rottner. 2013. Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J Cell Sci.* 126:4572-88.
- Steffen, A., K. Rottner, J. Ehinger, M. Innocenti, G. Scita, J. Wehland, and T.E. Stradal. 2004. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23:749-59.
- Stewart, D.M., L. Tian, and D.L. Nelson. 1999. Mutations that cause the Wiskott-Aldrich syndrome impair the interaction of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) with WASP interacting protein. *J Immunol.* 162:5019-24.



- Stuart, J.R., F.H. Gonzalez, H. Kawai, and Z.M. Yuan. 2006. c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J Biol Chem.* 281:31290-7.
- Suetsugu, S., M. Hattori, H. Miki, T. Tezuka, T. Yamamoto, K. Mikoshiba, and T. Takenawa. 2002. Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell.* 3:645-58.
- Suetsugu, S., S. Kurisu, T. Oikawa, D. Yamazaki, A. Oda, and T. Takenawa. 2006. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol.* 173:571-85.
- Suetsugu, S., H. Miki, and T. Takenawa. 1999. Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 260:296-302.
- Suraneni, P., B. Rubinstein, J.R. Unruh, M. Durnin, D. Hanein, and R. Li. 2012. The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J Cell Biol.* 197:239-51.
- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145:1009-26.
- Takenawa, T., and S. Suetsugu. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:37-48.
- Tehrani, S., N. Tomasevic, S. Weed, R. Sakowicz, and J.A. Cooper. 2007. Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:11933-8.
- Thiery, J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2:442-54.
- Ti, S.C., C.T. Jurgenson, B.J. Nolen, and T.D. Pollard. 2011. Structural and biochemical characterization of two binding sites for nucleation-promoting factor WASp-VCA on Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:E463-71.
- Torres, E., and M.K. Rosen. 2003. Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell.* 11:1215-27.
- Torres, E., and M.K. Rosen. 2006. Protein-tyrosine kinase and GTPase signals cooperate to phosphorylate and activate Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)/neuronal WASP. *J Biol Chem.* 281:3513-20.
- Uyeda, T.Q., C. Kitayama, and S. Yumura. 2000. Myosin II-independent cytokinesis in Dictyostelium: its mechanism and implications. *Cell Struct Funct.* 25:1-10.
- Vadlamudi, R.K., F. Li, C.J. Barnes, R. Bagheri-Yarmand, and R. Kumar. 2004. p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep.* 5:154-60.
- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, S.G. Komm, and L.V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol.* 24:625-40.
- Veltman, D. 2014. Actin dynamics: cell migration takes a new turn with arpin. *Curr Biol.* 24:R31-3.
- Veltman, D.M., and R.H. Insall. 2010. WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Mol Biol Cell.* 21:2880-93.
- Vinson, V.K., E.M. De La Cruz, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 1998. Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry.* 37:10871-80.
- Volkman, N., K.J. Amann, S. Stoilova-McPhie, C. Egile, D.C. Winter, L. Hazelwood, J.E. Heuser, R. Li, T.D. Pollard, and D. Hanein. 2001. Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science.* 293:2456-9.

- Wagner, A.R., Q. Luan, S.L. Liu, and B.J. Nolen. 2013. Dip1 defines a class of Arp2/3 complex activators that function without preformed actin filaments. *Curr Biol.* 23:1990-8.
- Wang, W., S. Goswami, E. Sahai, J.B. Wyckoff, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 2005. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol.* 15:138-45.
- Wang, X., L. He, Y.I. Wu, K.M. Hahn, and D.J. Montell. 2010. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol.* 12:591-7.
- Wear, M.A., A. Yamashita, K. Kim, Y. Maeda, and J.A. Cooper. 2003. How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr Biol.* 13:1531-7.
- Weaver, A.M., A.V. Karginov, A.W. Kinley, S.A. Weed, Y. Li, J.T. Parsons, and J.A. Cooper. 2001. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol.* 11:370-4.
- Weed, S.A., A.V. Karginov, D.A. Schafer, A.M. Weaver, A.W. Kinley, J.A. Cooper, and J.T. Parsons. 2000. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 151:29-40.
- Weiner, O.D., P.O. Nielsen, G.D. Prestwich, M.W. Kirschner, L.C. Cantley, and H.R. Bourne. 2002. A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol.* 4:509-13.
- Welch, M.D., A.H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997a. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol.* 138:375-84.
- Welch, M.D., A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997b. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 385:265-9.
- Welch, M.D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D.A. Portnoy, and T.J. Mitchison. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science.* 281:105-8.
- Winter, D., A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and R. Li. 1997. The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol.* 7:519-29.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U.H. von Andrian, E.I. Deryugina, A.Y. Strongin, E.B. Bocker, and P. Friedl. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 160:267-77.
- Wong, K., O. Pertz, K. Hahn, and H. Bourne. 2006. Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3639-44.
- Worthylake, R.A., S. Lemoine, J.M. Watson, and K. Burridge. 2001. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol.* 154:147-60.
- Wu, C., S.B. Asokan, M.E. Berginski, E.M. Haynes, N.E. Sharpless, J.D. Griffith, S.M. Gomez, and J.E. Bear. 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell.* 148:973-87.
- Wu, C., E.M. Haynes, S.B. Asokan, J.M. Simon, N.E. Sharpless, A.S. Baldwin, I.J. Davis, G.L. Johnson, and J.E. Bear. 2013. Loss of Arp2/3 induces an NF-kappaB-dependent, nonautonomous effect on chemotactic signaling. *J Cell Biol.* 203:907-16.
- Wu, Y.I., D. Frey, O.I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, and K.M. Hahn. 2009. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature.* 461:104-8.

- Xiong, Y., C.H. Huang, P.A. Iglesias, and P.N. Devreotes. 2010. Cells navigate with a local-excitation, global-inhibition-biased excitable network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:17079-86.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa, and J. Condeelis. 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol*. 168:441-52.
- Yamazaki, D., T. Fujiwara, S. Suetsugu, and T. Takenawa. 2005. A novel function of WAVE in lamellipodia: WAVE1 is required for stabilization of lamellipodial protrusions during cell spreading. *Genes Cells*. 10:381-92.
- Yamazaki, D., T. Oikawa, and T. Takenawa. 2007. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci*. 120:86-100.
- Yamazaki, D., S. Suetsugu, H. Miki, Y. Kataoka, S. Nishikawa, T. Fujiwara, N. Yoshida, and T. Takenawa. 2003. WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature*. 424:452-6.
- Yan, C., N. Martinez-Quiles, S. Eden, T. Shibata, F. Takeshima, R. Shinkura, Y. Fujiwara, R. Bronson, S.B. Snapper, M.W. Kirschner, R. Geha, F.S. Rosen, and F.W. Alt. 2003. WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *EMBO J*. 22:3602-12.
- Ydenberg, C.A., S.B. Padrick, M.O. Sweeney, M. Gandhi, O. Sokolova, and B.L. Goode. 2013. GMF severs actin-Arp2/3 complex branch junctions by a cofilin-like mechanism. *Curr Biol*. 23:1037-45.
- Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K.M. Yamada, B.Z. Katz, S. Lin, D.C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2:191-6.
- Zang, J.H., G. Cavet, J.H. Sabry, P. Wagner, S.L. Moores, and J.A. Spudich. 1997. On the role of myosin-II in cytokinesis: division of Dictyostelium cells under adhesive and nonadhesive conditions. *Mol Biol Cell*. 8:2617-29.
- Zech, T., S.D. Calaminus, P. Caswell, H.J. Spence, M. Carnell, R.H. Insall, J. Norman, and L.M. Machesky. 2011. The Arp2/3 activator WASH regulates alpha5beta1-integrin-mediated invasive migration. *J Cell Sci*. 124:3753-9.
- Zhang, Y., S. Liu, C. Mickanin, Y. Feng, O. Charlat, G.A. Michaud, M. Schirle, X. Shi, M. Hild, A. Bauer, V.E. Myer, P.M. Finan, J.A. Porter, S.M. Huang, and F. Cong. 2011. RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat Cell Biol*. 13:623-9.
- Zigmond, S.H. 2004. Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end. *Curr Top Dev Biol*. 63:145-88.
- Zuchero, J.B., B. Belin, and R.D. Mullins. 2012. Actin binding to WH2 domains regulates nuclear import of the multifunctional actin regulator JMY. *Mol Biol Cell*. 23:853-63.
- Zuchero, J.B., A.S. Coutts, M.E. Quinlan, N.B. Thangue, and R.D. Mullins. 2009. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol*. 11:451-9.
- Zuo, P., Z. Fu, T. Tao, F. Ye, L. Chen, X. Wang, W. Lu, and X. Xie. 2013. The expression of glia maturation factors and the effect of glia maturation factor-gamma on angiogenic sprouting in zebrafish. *Exp Cell Res*. 319:707-17.
- Zuo, P., Y. Ma, Y. Huang, F. Ye, P. Wang, X. Wang, C. Zhou, W. Lu, B. Kong, and X. Xie. 2014. High GMFG expression correlates with poor prognosis and promotes cell migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 132:745-51.



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Alexis Gautreau de m'avoir accueilli dans son laboratoire dès mon master. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet de thèse ambitieux. Merci de m'avoir permis de développer de nombreuses compétences techniques qui me seront sans doute extrêmement utiles par la suite, de m'avoir appris à organiser mes idées de façon claires et logiques que ce soit lors de communications orales ou pour l'écriture de papiers. Malgré les difficultés que l'on peut rencontrer au cours d'une thèse, je ne regrette absolument pas le passage dans le laboratoire d'Alexis, encore un grand merci.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Arnaud Echard, Philippe Chavrier, Carsten Janke d'avoir suivi mes travaux de thèse, d'avoir pu donner un jugement objectif et de précieux conseils sur l'avancée et sur les perspectives à mener.

Je souhaite remercier également Simon Saule d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, Ali Badache et Loïc Dupré d'avoir accepté le rôle de rapporteurs, ainsi que Philippe Chavrier et Maria Carla Parrini pour leur participation à mon jury de thèse.

Ensuite je voudrais remercier tous les membres de l'équipe qui ont partagé mon quotidien durant ces trois années. Merci à Emmanuèle, pour son aide et ses conseils que ce soit dans le domaine technique ou d'un point de vue personnel. Merci aussi d'avoir gardé précieusement les chocolats qui ont pu nous réconforter à de nombreuses reprises! Merci à Fabienne d'avoir toujours été là, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et ses bons gâteaux épicés :). Merci à la membre la plus assidue du club des insectes, Violaine, merci pour ses encouragements et son soutien. Merci à Véro l'anglaise pour sa sympathie. Je remercie aussi les autres membres de l'équipe que j'ai côtoyé, Ksenia, Anaïs, Roman, Sai, Nadia, Goran, Carla, et les nouvellement arrivés Dominique et Laurence. Je souhaite aussi remercier tout le LEBS, en particulier à Gemma, ma collègue de thèse ;)

Finalement, je souhaite remercier mes parents et ma famille Del, Amaury, Cece, Soph et la belle-famille, qui ont toujours été là et qui m'ont permis de décompresser de nombreux week-ends! Et je ne pourrai pas finir sans remercier LA personne sans qui je ne serai pas en thèse dans ce laboratoire et qui m'a transféré cette offre de thèse alors que je désespérais à trouver un laboratoire d'accueil: merci à ma moitié, Bastien. Merci de m'avoir supporté et de continuer de le faire, d'être toujours là pour m'encourager et me soutenir. Merci aussi à son temps consacré pour mes statistiques. Merci pour nos 10 jours de vacances annuels. Merci pour nos dizaines de week-ends annuels, les autres étant passés en compagnie de tes mouches ou passé au karaté le samedi après midi...Merci aussi de ne pas avoir eu le courage de lire ma thèse jusqu'au bout et d'avoir donc loupé ce magnifique hommage...! Un grand Merci pour tout ;)

P.S: merci aussi à Arpin, petite protéine pour laquelle j'ai consacré mon énergie durant ces trois années! Je lui souhaite de grandir et de devenir la nouvelle star du domaine de l'actine...

## **Migration cellulaire: identification d'Arpin, un nouvel inhibiteur du complexe Arp2/3, et mécanismes moléculaires de sa régulation**

### **Résumé :**

Dans une cellule en migration, la polymérisation d'actine branchée par le complexe Arp2/3, permet de projeter la membrane plasmique dans une structure appelée le lamellipode. La voie d'activation du complexe Arp2/3 par le complexe WAVE est a été bien étudiée. Cependant la migration cellulaire est finement régulée et cette unique voie de signalisation nous semblait insuffisante. En recherchant de nouveaux régulateurs, nous avons découvert une nouvelle protéine capable d'inhiber le complexe Arp2/3 *in vitro*. Nous l'avons appelée Arpin pour « Arp2/3 Inhibitor ». De manière cohérente avec son rôle inhibiteur *in vitro*, la déplétion d'Arpin dansl cellules, induit une augmentation de la vitesse de protrusion des lamellipodes et une migration plus rapide mais aussi plus directionnelle. Arpin joue donc le rôle de frein de la migration cellulaire et permet à la cellule de tourner. Pour jouer son rôle, Arpin nécessite d'être régulée rigoureusement. Dans la cellule, Arpin est inactive et nécessite d'être activée par Rac de manière indirecte. Nous avons identifié Tankyrase comme protéine interagissant avec Arpin. De façon intéressante, le motif d'interaction d'Arpin qui permet son interaction avec Tankyrase se superpose à la séquence acide nécessaire pour l'interaction avec le complexe Arp2/3. Ceci a permis d'identifier *in vitro* une compétition entre Tankyrase et le complexe Arp2/3 sur Arpin, et suggère que Tankyrase inhibe Arpin.

Arpin joue donc un rôle important dans le contrôle de la migration cellulaire. Nous nous attendons donc à ce qu'Arpin soit impliquée dans des nombreux processus physiologiques où la migration cellulaire joue un rôle important, en particulier dans le cancer.